

**GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE ANALYSE
DES SELEN-STOFFWECHSELS
IN ESCHERICHIA COLI**

Walfred Leinfelder

Disbui. München

1989

**GENETISCHE UND BIOCHEMISCHE ANALYSE
DES SELEN-STOFFWECHSELS
IN ESCHERICHIA COLI**

**Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Walfred Leinfelder
aus München**

Juni 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Jäckle

Tag der mündlichen Prüfung: 4.8.1989

A B K Ö R Z U N G E N

Ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfon- säure
kb	Kilobasenpaar
Km	Kanamycin
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
NADP	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
OD _x	"optische Dichte" = Absorption bei einer Wellen- länge von x nm
PMS	Phenazinmethosulfat
psi	pounds per square inch
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
tRNA	transfer RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Abkürzungen für Restriktionsenzyme

A	AvaII	M	MluI
As	Asp700	Nc	NcoI
Av	AvaI	Nd	NdeI
B	BamHI	Ne	NheI
Bc	BclI	P	PstI
Bs	BstEII	S	SalI
C, C ^x	ClaI	Sc	ScaI
E	EcoRI	Sm	SmaI
EV	EcoRV	Sp	SphI
H	HindIII	Ss	SspI
Hc	HincII	Su	Sau3A
Hf	HinfI	X	XhoI
Hn	HinPI		

^x: Schnittstelle in nicht dam-methylierter DNA aus WA321.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	9
I. Verwendete Mikroorganismen und Plasmide	9
II. Verwendete Nährmedien	12
III. Wachstum von Bakterien	14
IV. Anaerobes Arbeiten	14
V. Vermehrung von Bakteriophagen	14
VI. Genetische Methoden	15
1. Mutagenese	15
a) Transposonmutagenese mit dem Phagen Mu d1	15
b) Mutagenese mit Hilfe klonierter DNA-Fragmente	15
2. Transfer genetischer Marker	15
VII. Molekulargenetische Methoden	15
1. Isolierung von DNA aus Bakterien	15
a) Isolierung chromosomaler DNA	15
b) Isolierung von Plasmid-DNA	16
2. Isolierung von Gesamt-tRNA aus Bakterien	16
3. Methoden zur in vitro Rekombination von DNA	16
4. Transformation von Bakterien	17
5. In vitro Verpackung von Cosmid-DNA	17
6. In vitro Markierung von DNA-Fragmenten mit ³² P-Phosphat	18
a) Endmarkierung von DNA-Fragmenten	18
b) Nicktranslation	18
7. DNA-DNA Hybridisierungen	18

8. DNA-Sequenzierung	19
a) Chemische Methode	19
b) Enzymatische Methode	19
c) Sequenzgele	19
d) Computeranalyse der ermittelten Einzel- sequenzen	19
VIII. Physiologische Testreaktionen	20
1. Test auf FDH _N - und FDH _H -Aktivität	20
2. Test auf Nitratreduktase-Aktivität	20
IX. Proteinchemische und enzymatische Methoden	20
1. Präparation zellfreier Extrakte und enzyma- tische Testreaktionen	20
a) Enzymtest für β -Galaktosidase	20
b) Test auf Formiatdehydrogenase-Aktivität	21
c) Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Test	21
2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
3. Proteinbestimmung	22
X. Expression plasmidkodierter Gene	22
1. Spezifische Markierung plasmidkodierter Gen- produkte mit ^{35}S -Methionin	23
2. Überexpression plasmidkodierter Gene	23
XI. Dünnschicht-Chromatographie	23
XII. In vivo Markierung mit ^{75}Se -Selenit	24
1. Nachweis von Selenoproteinen	24
2. Nachweis von Selenocysteyl-tRNA _{U_{CA}}	24
a) In vivo Markierung und Isolierung amino- acylierter Gesamt-tRNA	24
b) Derivatisierungsreaktionen	25
XIII. Derivatisierung von Selenocystein	26
XIV. In vitro Synthese von Selenocysteyl-tRNA _{U_{CA}}	26
1. Präparation der zellfreien Extrakte	26
2. In vitro Umwandlung von Seryl-tRNA _{U_{CA}} in Selenocysteyl-tRNA _{U_{CA}}	27
XV. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen	28

I. Isolierung und Charakterisierung von Mutanten mit defektem Selenstoffwechsel	29
1. Isolierung der Mutanten	29
2. Charakterisierung der Mutanten	30
a) Test auf FDH_H -Phänotyp und intakten Molybdän-Stoffwechsel	30
b) Einbau von Selen in FDH_H und FDH_L	31
c) Test auf Formiatdehydrogenase-Aktivität	33
3. Charakterisierung von Mutanten mit beschriebenen Defekten in <u>fdhA</u> , <u>fdhB</u> und <u>fdhC</u>	34
4. Einfluß von Mutationen im Selenstoffwechsel auf die Translation von <u>fdhF-lacZ</u> Genfusionen	36
II. Klonierung und Analyse der Gene <u>selA</u> und <u>selB</u>	38
1. Klonierungsstrategie, Stammkonstruktion und Anlegen einer Genbibliothek	38
2. Klonierung von <u>selA</u> und <u>selB</u>	40
3. Komplementationsanalyse und Subklonierung des <u>selA</u> Gens	41
4. Analyse des Seleneinbaus	45
5. Eingrenzung des <u>selB</u> Gens durch Konstruktion von Bal31-Deletionsklonen	45
6. Sequenzierung der Gene <u>selA</u> und <u>selB</u>	50
7. Rückhybridisierung der klonierten DNA-Fragmente	55
8. Expression des <u>selA</u> und <u>selB</u> Gens mit Hilfe des T7 RNA Polymerase/Promotor Systems	59
III. Klonierung und Analyse des <u>selC</u> Gens	64
1. Klonierung von <u>selC</u>	64
2. Subklonierung von <u>selC</u>	65
3. Inaktivierung von <u>selC</u>	67
4. Sequenzierung von <u>selC</u> und Analyse der Sequenzdaten	70

IV. Klonierung und Sequenzierung des mutierten <u>selC</u> Gens (<u>selC</u> [*]) aus MB07	73
1. Rückhybridisierung des klonierten <u>selC</u> [*] Gens mit chromosomaler DNA aus MB07 (<u>selC</u> [*])	73
2. Klonierung und Sequenzierung des <u>selC</u> [*] Gens	75
V. Klonierung und Analyse des <u>seld</u> Gens	77
1. Klonierung von <u>seld</u>	77
2. Sequenzierung von <u>seld</u>	79
3. Genetische Charakterisierung der <u>sela1</u> Mutante von Salmonella typhimurium	81
a) Einbau von Selen durch die Mutante TA4325 mit dem plasmidkodierten <u>seld</u> Gen aus E. coli	82
b) Heterologe Hybridisierung chromosomaler DNA aus Salmonella typhimurium mit dem <u>seld</u> Gen aus E. coli	82
VI. In vitro Aminoacylierung des <u>selC</u> Genprodukts	86
1. Versuche zur Bestimmung der Aminosäurespezifität des <u>selC</u> Genprodukts	86
2. Einfluß von Mutationen in <u>selC</u> auf die Beladung	90
3. Einfluß von <u>sela</u> , <u>selB</u> und <u>seld</u> Mutationen auf die Beladung des <u>selC</u> Genprodukts	92
VII. Nachweis des in vivo Vorkommens von Selenocysteyl-tRNA _{UcA}	94
VIII. Einfluß von Mutationen in <u>sela</u> , <u>selB</u> und <u>seld</u> auf die Bildung von Selenocysteyl-tRNA _{UcA} in vivo	99
IX. In vitro Umwandlung von Seryl-tRNA _{UcA} in Selenocysteyl-tRNA _{UcA}	105
1. Enzymatische Umwandlung von Serin in Selenocystein	105
2. Abhängigkeit der Selenocysteyl-tRNA Bildung von der Art des Selen-Donors	111
3. Kompatibilität des selenierenden Systems von E. coli und tRNA _{UcA} aus Proteus vulgaris	115

4. Untersuchungen zur Beteiligung der <u>selA</u> , <u>selB</u> und <u>selD</u> Genprodukte an der Umwandlung von Seryl-tRNA ^{uCA} in Selenocysteyl-tRNA ^{uCA}	117
--	-----

DISKUSSION	122
------------	-----

ZUSAMMENFASSUNG	139
-----------------	-----

LITERATUR	141
-----------	-----



EINLEITUNG

Selen, von Berzelius im Jahre 1817 entdeckt, und lange Zeit ausschließlich als Gift betrachtet, ist heute als essentielles Spurenelement bekannt. Krankheiten wie Lebernekrosen bei Ratten, Weißmuskelkrankheit bei Lämmern und Kälbern, oder exudative Diathese bei Hühnern konnten auf Selenmangel zurückgeführt werden (104, 112).

Ein erster Anhaltspunkt über die biochemische Funktion von Selen kam bereits 1954 von J. Pinsent. Sie wies nach, daß *E. coli* nur dann aktive Formiatdehydrogenase (FDH) bilden kann, wenn ausreichend Selenit und Molybdat im Medium vorhanden sind (94).

Spätere Untersuchungen an selenarm ernährten Ratten zeigten eine Korrelation zwischen Selenmangel und einer verringerten Aktivität der Glutathionperoxidase (99). Glutathionperoxidase war damit das erste als Selenoprotein identifizierte Enzym. Durch in vivo Markierung mit radioaktivem ^{75}Se -Selenit wurde gefunden, daß Selen spezifisch in Glutathionperoxidase eingebaut wird (99). Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten wurde gereinigt, und als Tetramer, bestehend aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 21 000 Da, charakterisiert. Pro Mol Untereinheit wurde ein Mol Selen nachgewiesen (34). Die selenhaltige Komponente wurde als Selenocystein identifiziert, das als Teil der Polypeptidkette vorliegt und an der Katalyse beteiligt ist (36, 131). Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von organischen Peroxiden und von Wasserstoffperoxid und schützt dadurch die Zellmembran vor oxidativen Schädigungen. Die Selenolgruppe von Selenocystein wechselt dabei die Oxidationsstufe. Als Elektronen-

donator dient Glutathion (35).

Verbreitung von Selenoenzymen in Prokaryonten

In Prokaryonten wurden bisher mehrere Enzyme gefunden, in denen Selenocystein kovalent gebunden als Teil der Aminosäurekette vorliegt. Auch diese Enzyme sind an Redoxvorgängen in der Zelle beteiligt.

In Clostridien wurde Glycinreduktase als Selenoenzym identifiziert (121). Glycinreduktase katalysiert die reduktive Desaminierung von Glycin zu Acetat. Der Elektronentransfer ist mit ATP-Synthese gekoppelt. Der Enzymkomplex besteht aus mindestens drei verschiedenen Untereinheiten. Eine Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 12 000 Da, das Selenoprotein A, enthält kovalent gebundenes Selenocystein (24). Eine gesteigerte Synthese des Selenopolypeptids kann durch Supplementierung der Zellen mit Selenit erreicht werden und hat eine erhöhte spezifische Aktivität der Glycinreduktase im Zellextrakt zur Folge (121).

In *Methanococcus vannielii* wurde eine selenabhängige Hydrogenase entdeckt (129). Das Enzym setzt sich aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 56 000 Da, 42 000 Da und 35 000 Da zusammen. Das 42 000 Da Polypeptid ist ein Selenopolypeptid und enthält Selen in Form von Selenocystein. Das Molekulargewicht des Enzymkomplexes wurde mit 340 000 Da bestimmt.

Selenhaltige Formiatdehydrogenasen wurden in den strikt anaeroben Bakterien *Clostridium thermoaceticum* (128) und *Methanococcus vannielii* (61) und in den fakultativ anaeroben Bakterien *Salmonella typhimurium* (66) und *E. coli* (25) nachgewiesen.

Die Enzyme der strikt anaeroben Bakterien enthalten singuläre Selenocysteinreste in Polypeptiden von ca. 100 000 Da.

Beide Enzyme weisen neben den Selenocysteinresten weitere Redoxzentren auf. Die FDH aus *M. vannielii* besitzt eine weitere, nicht selenhaltige Untereinheit von 105 000 Da, die einen Molybdopterin-Cofaktor und zehn Eisen-Schwefel-Zentren enthält (114). Der Enzymkomplex benützt F_{420} (5-Deazaflavin) als Elektronenakzeptor und ist an der Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid und Methan beteiligt.

Die FDH aus *Cl. thermoaceticum* katalysiert die Reduktion von CO_2 zu Formiat. Als Elektronen-Donator dient NADPH. Das Enzym wurde als Tetramer, bestehend aus 2 Selenopolypeptiden und 2 weiteren, identischen Untereinheiten (76 000 Da), beschrieben und enthält Eisen-Schwefel-Zentren und Wolfram.

Selenoproteine in *E. coli*

E. coli bildet zwei selenierte Polypeptide, die den Formiatdehydrogenasen, FDH_H und FDH_L , zugeordnet werden konnten (25). Unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von Nitrat wird die Synthese der FDH_H (101), in Abwesenheit von Nitrat die Synthese der FDH_L induziert (100).

Die FDH_H ist ein Bestandteil der Formiat-Nitrat-Atmungskette. Sie bildet mit der Nitratreduktase einen membrangebundenen Komplex und liefert durch Oxidation von Formiat Elektronen für die Reduktion von Nitrat zu Nitrit (101). Als Elektronenüberträgermoleküle dienen in dieser Reaktionskette Cytochrom b und Coenzym Q (31, 101). In vitro werden zur Bestimmung der Enzymaktivität die künstlichen Elektronenakzeptoren Phenazinmethosulfat und Dichlorphenol-indophenol verwendet (31). FDH_H wurde von Enoch und Lester (31) gereinigt und charakterisiert. Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten zu 110 kDa (α), 30 kDa (β) und 20 kDa (γ) in einer Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Das 110 kDa Polypeptid enthält kovalent gebundenes Selen. Die Selenkomponente zeigt die charakteristischen Eigenschaften von

Selenocystein (113).

FDH₂ ist Bestandteil des Formiat-Hydrogenlyase-Enzymkomplexes, der Formiat in die gasförmigen Produkte H₂ und CO₂ zerlegt (93). Der Enzymkomplex setzt sich aus der FDH₂, nicht identifizierten Elektronencarriern, und einer Hydrogenase zusammen. Die Formiat-Hydrogenlyase-Reaktion ist nicht energieliefernd und dient allein dem Ausgleich der Redoxbilanz (45). Eine genaue biochemische Charakterisierung der FDH₂ war bisher aufgrund der extremen Labilität des Enzyms nicht möglich. In vitro wird für die Bestimmung der Enzymaktivität als künstlicher Elektronenakzeptor Benzylviologen verwendet (72). Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der FDH₂ brachten widersprüchliche Ergebnisse. Je nach Art der Zellaufbruchmethode wurde das Enzym im Cytoplasma (93) bzw. in der Membranfraktion (100) oder in beiden (25) nachgewiesen. Durch in vivo Selenmarkierungen wurde ein 80 kDa Selenopolypeptid als Untereinheit der FDH₂ identifiziert (25). Dieses Polypeptid enthält Selenocystein kovalent gebunden als Teil der Aminosäurekette (133). Der Selenocysteinrest ist an der Katalyse beteiligt (132).

Beide Formiatdehydrogenasen enthalten als essentiellen Cofaktor Molybdopterin (115). Pleiotrope Mutanten, die chloratresistent sind, besitzen einen Defekt im Molybdän-Stoffwechsel (115). Dieser Defekt führt zum Ausfall aller Molybdoenzyme, darunter beide Formiatdehydrogenasen und Nitratreduktase (40, 81).

Darüberhinaus wurde eine weitere Klasse von pleiotropen Mutanten isoliert, in denen die FDH-Aktivitäten fehlen, Nitratreduktase-Aktivität jedoch vorhanden ist. Die betroffenen Genloci wurden mit fdhA, B, C, bezeichnet (43, 47, 77). Die Ursache für den pleiotropen Phänotyp war zu Beginn der hier dargestellten Arbeiten nicht bekannt.

Selenierte tRNA's

Neben selenhaltigen Enzymen gibt es eine weitere Klasse von Biomolekülen, in die Selen spezifisch eingebaut wird. Dabei handelt es sich um tRNA-Moleküle. Selenierte tRNA's wurden in *Methanococcus vannielii* (18), *Clostridium sticklandii* (14, 17), *E. coli* (125) und in Leukämie-Zelllinien der Maus (15) nachgewiesen. Soweit bisher bekannt ist, enthalten selenierte tRNA's in Prokaryonten Selen in Form von 5-Methylaminomethyl-2-Selenouridin ($\text{mnm}^5\text{Se}^2\text{U}$) (127).

In *E. coli* wurden bisher zwei tRNA-Spezies identifiziert, in denen dieses Selenonukleosid vorkommt; es sind Isoakzeptoren für Glutamat und Lysin (125). In beiden tRNA-Spezies von *E. coli* und in tRNA^{Glu} von *Clostridium sticklandii* tritt das Selenonukleosid in der "wobble" Position des Anticodons auf. Das selenhaltige Uridin erleichtert die Erkennung eines Guanins an der 3. Position des Codons für Glutamat und Lysin (16, 126). Aufgrund dieser Befunde wird spekuliert, daß den selenhaltigen tRNA's eine regulatorische Funktion in der Translation zukommen könnte (114). Möglicherweise beeinflußt das Vorkommen von $\text{mnm}^5\text{Se}^2\text{U}$ in tRNA^{Glu} aus *Cl. sticklandii* auch die Akzeptoraktivität dieser tRNA. Es wurde gefunden, daß die Abnahme des Selengehalts in tRNA^{Glu} in vitro die Beladung mit Glutamat verhindert (17).

Auch der Mechanismus des Einbaus von Selen in tRNA^{Glu} und tRNA^{Lys} in *E. coli* wurde untersucht. Werden selenarm angezogene Kulturen von *E. coli* mit Selenit supplementiert, kommt es zu einer Zunahme des Gehalts an $\text{mnm}^5\text{Se}^2\text{U}$ in tRNA^{Lys} und tRNA^{Glu}. Entsprechend nimmt die Menge an $\text{mnm}^5\text{S}^2\text{U}$ in tRNA^{Lys} und tRNA^{Glu} ab (126). Weitere Untersuchungen zeigten, daß $\text{mnm}^5\text{S}^2\text{U}$ der direkte Vorläufer von $\text{mnm}^5\text{Se}^2\text{U}$ ist. In vitro Studien deuten auf einen ATP-abhängigen Reaktionsmechanismus hin. Das Schwefelatom an Position 2 des modifizierten Uridinrests wird möglicher-

weise nach Aktivierung gegen Selen ausgetauscht. Als Selen-Donor für diese Reaktion können in vitro Selenat, Selenit und Selenocystein verwertet werden. Selenomethionin hingegen kann nicht als Selen-Donor dienen. Durch Zugabe von Sulfit oder Cystein wird der Austausch von Schwefel gegen Selen nicht beeinflusst (126).

Selenocystein wird durch ein UGA Codon kodiert

Nachdem Selenocystein in einer Reihe von Enzymen als Teil der Aminosäurekette identifiziert worden war, konzentrierte sich das Interesse vor allem darauf, ob es ein bestimmtes Codon für Selenocystein gibt.

Von Chambers et al. (12) wurde das Strukturgen für Glutathionperoxidase der Maus kloniert und sequenziert. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte sehr hohe Homologie zu den durch Proteinsequenzierung bereits bekannten Sequenzen der Glutathionperoxidase aus Ratte (23) und Rind (46). Überraschenderweise wurde dabei aber im Strukturgen ein "in-frame" TGA (Stopp) Codon gefunden. An entsprechender Position in den homologen Proteinen aus Ratte und Rind befindet sich ein Selenocysteinrest. Daraus folgerten die Autoren, daß das UGA Codon in der mRNA für Selenocystein kodieren könnte. Um auszuschließen, daß die Ursache für das TGA Codon in einem Klonierungsartefakt begründet ist, wurde auch die mRNA des Gens für Glutathionperoxidase sequenziert. Diese Analysen bestätigten die durch DNA-Sequenzanalyse erhaltenen Befunde (12).

In der Folge wurden die Strukturgene der Glutathionperoxidasen aus Mensch (57, 84, 118), Rind (85) und Ratte (53) kloniert und sequenziert. Auch sie enthielten ein "in-frame" TGA (Stopp) Codon. Für alle Gene konnte auch gezeigt werden, daß sich an entsprechender Position in den Aminosäuresequenzen die ungewöhnliche Aminosäure Selenocystein befindet.

Darüberhinaus konnte in dem Gen fdhF, welches für das 80 kDa Selenopolypeptid der FDH_s aus *E. coli* kodiert, ebenfalls ein TGA Codon nachgewiesen werden, das für den Einbau von Selenocystein essentiell ist (132, 133).

Der Einbau von Selenocystein in das 80 kDa Polypeptid der FDH_s erfolgt cotranslational

Das Gen fdhF enthält an Position der Aminosäure 140 ein "in-frame" TGA (Stopp) Codon. Folgende Ergebnisse zeigten, daß das UGA Codon der fdhF mRNA translatiert wird und den Einbau von Selenocystein in das Polypeptid dirigiert (132, 133):

1. Die Konstruktion von C-terminalen Deletionen von fdhF und die anschließende Expression der veränderten Gene führte zur Synthese von verkürzten Selenopolypeptiden, deren Größe mit der Größe der jeweiligen offenen Leserahmen korrelierte.
2. Es wurden verschiedene fdhF-lacZ Genfusionen konstruiert, in denen sich die Fusionsstellen 5' bzw. 3' des TGA Codons in fdhF befanden. Die Synthese selenierter Hybridproteine korrelierte mit der Anwesenheit des TGA Codons im fdhF-Anteil.

Die Translation der mRNA von Genfusionen, die das TGA Codon im fdhF-Anteil enthielten, war abhängig von der Anwesenheit von Selen im Medium. Unabhängig von der Anwesenheit von Selen war hingegen die Translation der mRNA von Genfusionen, die kein TGA enthielten. Diese Ergebnisse, die durch Northern Blot Analysen der fdhF Transkripte bestätigt werden konnten, zeigten, daß Selen nicht für die Transkription von fdhF, sondern allein für die Translation des UGA Codons in der fdhF mRNA erforderlich ist.

3. Durch lokalisierte Mutagenese wurde das TGA Codon in fdhF gegen ein Cystein (TGC) und Serin (TCA) Codon ausgetauscht. Diese Mutationen führten zur Selenunabhängigkeit der Translation von fdhF. Der Austausch gegen TCA führte zum völligen Ausfall der Selenierung und der Enzymaktivität der FDH_s. In Anwesenheit eines TGC Codons (anstelle von TGA) wurde eine stark verringerte Selenierungs-Effizienz beobachtet.

Zusammenfassend beweisen diese Resultate, daß der Einbau von Selenocystein cotranslational, dirigiert durch ein UGA Codon der fdhF mRNA, erfolgt. In diesen Untersuchungen ließ sich auch zeigen, welchen Einfluß der Austausch von Selenocystein gegen Cystein auf die Enzymaktivität der FDH_s hat. Das cysteinhaltige Genprodukt besitzt eine erheblich geringere spezifische Aktivität (ca. 25 %). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß der Selenocysteinrest an der enzymatischen Katalyse beteiligt ist und macht deutlich, welchen Vorteil die reaktivere Selenolgruppe gegenüber der Thiolgruppe hat.

Es war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht bekannt, über welchen Mechanismus die Aminosäure Selenocystein in die FDH_s eingebaut wird. Es gab auch keine Information darüber, über welchen Weg diese "unübliche" Aminosäure in der Zelle synthetisiert wird.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Identifizierung und Analyse von Genen und Genprodukten, die für die Biosynthese und den Einbau von Selenocystein in die Formiatdehydrogenasen von *E. coli* erforderlich sind.

MATERIAL UND METHODEN

I. Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien-Stämme, ihr Genotyp und ihre Herkunft sind in den Tabellen 1a und 1b zusammengefaßt. Die Genbezeichnungen wurden von Bachmann (3) übernommen. In Tabelle 2 sind die verschiedenen Plasmidvektoren und rekombinanten Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgelistet.

Die im Verlauf dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind im Teil "Ergebnisse" dargestellt.

Tabelle 1a: Stämme von E. coli K-12

Stamm	Genotyp	Referenz
AB1157	F ⁻ thi-1 thr-1 leuB6 proA2 hisG4 argE3 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 λ ⁻	(3)
CES200	AB1157, recB21 recC22 sbcB15 sbcC201 sup ^o thr::Tn10 hsdR	F. Barany
JC10289	AB1157, Δ (srl-recA) 306::Tn10	(56)
WA321	AB1157, dam-4	(28)
DH1	F ⁻ thi-1 hsdR17 recA1 endA1 relA1 supE44 λ ⁻	(48)
K38	HfrC phoA4 pit-10 tonA22 ompF627 relA1 spoT1 λ ⁺	(75)
KL235	HfrC phoA4 supD32 rel-1 serS15 tonA22 ompF627	(73)

Stamm	Genotyp	Referenz
FM1200	F ⁻ Δ(pro-lac) thi supE endA sbcB15 rpsL	F. Zinoni
MAL103	F ⁻ Δ(proAB-lac)X111 rpsL Mu cts Mu cts d1(Ap ^r lac)	(11)
Spc13	thi met rna spc13	(38)
EMG29	F ⁻ proC23 trp-30 his-51 lac-28 rpsL101 λ ⁺	(43)
GY01	EMG29, selA160 ¹	(43)
GY12	EMG29, selB162 ¹	(77)
MB07	EMG29, selC163 ²	(47)
MN1	EMG29, selC163 Δ(srl-recA)306::Tn10	A
GY02	EMG29, selD164 ¹	(77)
MB08	EMG29, selD165 ³	(43)
MN30	EMG29, selD165 Δ(srl-recA)306::Tn10	A
P4X	Hfr metB1 relA1 λ ⁺	(43)
FD3	P4X, selA161 ¹	(43)
FD7	P4X, selD166 ³	(43)
MN31	P4X, selD166 Δ(srl-recA)306::Tn10	A
FD08	P4X, selD167 ³	(43)
MN32	P4X, selD167 Δ(srl-recA)306::Tn10	A
MC4100	F ⁻ araD139 Δ(argF-lac)U169 ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsL150 λ ⁻	(11)
FM420	MC4100, srl-300::ΔTn10 recA56	(133)
WL2	MC4100, selA2::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL5	MC4100, selA5::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL6	MC4100, selA6::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL14	MC4100, selA14::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL1	MC4100, selB2::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL40	MC4100, selB40::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL98	MC4100, selB98::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL4	MC4100, sel-4::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL51	MC4100, sel-51::Mu cts d1 (Ap ^r lac)	A
WL153	MC4100, selB153::Mu cts d1(Ap ^r lac)	A
WL20153	MC4100, selB153::Mu d1(Ap ^r lac)*	A

Stamm	Genotyp	Referenz
WL40153	FM1200, selB153::Mu d1(Ap ^r lac)*	A
WL41153	FM1200, selB153::Mu d1(Ap ^r lac)* Δ(srl-recA)306::Tn10	A
WL50153	MC4100, selB153::Mu d1(Ap ^r lac)*	A
WL30153	MC4100, Δ(selAB)200	A
WL31153	MC4100, Δ(selAB)200 Δ(srl-recA)306::Tn10	A
WL60153	MC4100, Δ(selAB)200 selD204::cat	A
WL400	MC4100, selD204::cat	A
WL4000	MC4100, selD204::cat Δ(selB)202::neo	A

A: diese Arbeit

*: temperaturinsensitiv, Wachstum bei 43°C

¹: alte Bezeichnung fdhA, diese Arbeit

²: alte Bezeichnung fdhC, diese Arbeit

³: alte Bezeichnung fdhB, diese Arbeit

Tabelle 1b: Stämme von Salmonella typhimurium LT2

Stamm	Genotyp	Referenz
TL117	Δ(proAB)47	(26)
TA4325	selA1	(66)

Tabelle 2: Verwendete Plasmidvektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Genotyp/Phänotyp	Referenz
pACYC184	4.2	Cm ^r Tc ^r	(13)
pBR322	4.4	Ap ^r Tc ^r	(7)
pFM54	12.8	Ap ^r ϕ (fdhF'-'lacZ)hyb420(TGA)*	(132)
pFM58	12.8	Ap ^r ϕ (fdhF'-'lacZ)hyb423(TCA)*	(132)
pGP1-2	7.2	Km ^r T7 Gen 1	(120)
pHC79	6.4	Ap ^r Tc ^r	(54)
pHP45Q	4.3	Ap ^r Sm ^r Spc ^r	(95)
pT7-4	2.4	Ap ^r T7 ϕ 10	S. Tabor
pT7-6	2.2	Ap ^r T7 ϕ 10	S. Tabor
pUC18	2.7	Ap ^r lac'IPOZ' α	(87, 130)

* Codon in Position 140 des fdhF Gens

II. Verwendete Nährmedien

Folgende Medien wurden verwendet:

Vollmedien:

LB	(82)	1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.5 % NaCl
TGYES		LB + 0.4 % Glucose
TGYE		1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.2 % Glucose
TGYEP	(5)	1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.4 % Glucose 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5
YM	(106)	1 % Trypton, 0.01 % Hefeextrakt, 0.5 % NaCl, 0.2 % Maltose

Minimalmedium:

WM (37) 100 mM KH_2PO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 , 12 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
1 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 10 μM Na_2MoO_4 ,
1 μM Na_2SeO_3 ; pH 6.5.

Feste Nährböden:

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1.5 % Agar. Zur Herstellung von Weichagar wurde 0.65 % Agar zugesetzt.

MacConkey Indikatoragar: 40 g Difco Fertigagar auf 1 l deionisiertes Wasser, zusätzlich 0.3 % Agar, 1 % C-Quelle

MacConkey-Nitrat-Agar: 40 g Difco Fertigagar auf 1 l deionisiertes Wasser, zusätzlich 0.3 % Agar, 1 % KNO_3 , 0.1 % Glycerin, 0.05 % Na-Formiat, 0.01 % Glucose
(4)

Supplemente wurden nach dem Autoklavieren steril in folgender Endkonzentration zugegeben:

Aminosäuren	40 $\mu\text{g/ml}$
Nucleinbasen	20 $\mu\text{g/ml}$
Vitamin B1	5 $\mu\text{g/ml}$

Selektivmedien enthielten Antibiotika in folgender Konzentration:

Ampicillin	30 $\mu\text{g/ml}$ (Mu-lysogene Stämme)
	50 $\mu\text{g/ml}$ (plasmidkodierte Resistenz)
Chloramphenicol	15 $\mu\text{g/ml}$ (chromosomal kodierte Resistenz)
	30 $\mu\text{g/ml}$ (plasmidkodierte Resistenz)
Kanamycin	50 $\mu\text{g/ml}$ (plasmidkodierte Resistenz)
Tetracyclin	15 $\mu\text{g/ml}$ (chromosomal kodierte Resistenz)

III. Wachstum von Bakterien

Anzuchten von Flüssigkulturen erfolgten entweder in Wasserbadschüttlern (Modell G76, New Brunswick Scientific) bei definierter Temperatur (30°C oder 37°C) oder auf Tischrundschüttlern in einem auf 37°C temperierten Brutraum (Modell TK1, Braun Melsungen).

Aerobe Anzuchten von Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben, die mit einem Zehntel ihres Nennvolumens mit Medium gefüllt waren, durchgeführt. Die Belüftung der Kulturen wurde durch starkes Schütteln erreicht.

Anaerobe Anzuchten von Flüssigkulturen erfolgten entweder unter 100 % N₂-Atmosphäre in Serumflaschen oder in Meplatsflaschen, die bis zum Rand mit Medium gefüllt waren.

Aerobes Wachstum auf Nährböden erfolgte im Temperaturkonstantraum, anaerobes Wachstum auf Nährböden in einem Anaerobentopf unter 100 % N₂-Atmosphäre mit Überdruck.

Fermenteranzuchten wurden im 50 l Fermenter (Braun Melsungen U 50 D) durchgeführt. Das verwendete Medium war TGYES-Medium mit 100 mM K-Phosphatpuffer pH 6.5 und 10 mM MgCl₂.

IV. Anaerobes Arbeiten

Anaerobe Handhabungen fanden statt in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products, Inc.) unter einer Atmosphäre von 96 % N₂ und 4 % H₂. Die anaerobe Ernte von Zellen wurde in gasdichten Stahlzentrifugenbechern durchgeführt.

V. Vermehrung von Bakteriophagen

Die Vermehrung des Phagen Plk_c (71) wurde nach den Angaben von Miller (82) durchgeführt.

Die Präparation des Mu d1-Phagenlysats erfolgte nach der Methode von Casadaban und Cohen (11).

VI. Genetische Methoden

1. Mutagenese

a) Transposonmutagenese mit dem Phagen Mu d1

Die Transposonmutagenese wurde nach den Angaben von Casadaban und Cohen (11) durchgeführt.

Die Deletion der Mu d1-Phagen aus dem Chromosom geschah durch Hitzeinduktion (43°C) der Mu-lysogenen Stämme (F. Zinoni, persönliche Mitteilung). Die hitzeresistenten Klone wurden anschließend auf Ampicillinsensitivität und den gewünschten Phänotyp der Mutation getestet.

Die Stabilisierung und Immobilisierung von Mu d1-Insertionen erfolgte nach Blum et al. (6).

b) Mutagenese mit Hilfe klonierter DNA-Fragmente

Die Konstruktion definierter chromosomaler Insertionen und Deletionen wurde nach der Methode von Winans et al. (123) durchgeführt.

2. Transfer genetischer Marker

Transduktionen mit dem Phagen Plkc erfolgten nach den Angaben von Miller (82).

VII. Molekulargenetische Methoden

1. Isolierung von DNA aus Bakterien

a) Isolierung chromosomaler DNA

Chromosomale DNA wurde nach der Methode von Joyet et al. (62) isoliert, jedoch mit einer zusätzlichen Phenolextrak-

tion vor der Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Dichtegradienten. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

b) Isolierung von Plasmid-DNA

Schnellpräparationen aus Übernachtskulturen bis zu 5 ml wurden nach der Methode der alkalischen Lyse (78) durchgeführt.

Großpräparationen von Plasmid-DNA erfolgten nach der Methode von Clewell und Helinski (21). Die Plasmide wurden durch zweimalige Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Dichtegradienten gereinigt (78). Zur Amplifizierung der Plasmid-DNA wurde Chloramphenicol (170 µg/ml) oder Spektinomycin (300 µg/ml) verwendet (20, 108).

2. Isolierung von Gesamt-tRNA aus Bakterien

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Gesamt-tRNA dienten E. coli Zellen, die aerob in LB oder TGYES mit 10mM MgCl₂ angezogen wurden. Die Kulturen wurden in der spät-logarithmischen Wachstumsphase geerntet, die Zellen in TMN-Puffer (50 mM Tris/Cl, pH 7.5, 10 mM MgAc₂, 30 mM NH₄Cl) gewaschen, und in 2 Vol TMN-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in einer French Pressure Zelle (American Instruments Company) bei 18 000 psi aufgebrochen; das Debris wurde durch Zentrifugation bei 30 000 x g entfernt. Durch Phenolextraktion (30) und fraktionierte Isopropanolfällung (134) wurde die Gesamt-tRNA isoliert.

3. Methoden zur in vitro Rekombination von DNA

Die Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde gemäß den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten er-

folgte in horizontalen Agarosegelen. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0.6 % und 1.5 % verwendet (78). Als Laufpuffer diente TBE-Puffer (89 mM Tris/Cl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.3) (78), als Längenstandard λ -DNA, gespalten mit HindIII oder HindIII und EcoRI.

Für Ligationen wurden Vektor-DNA und zu klonierende DNA in äquimolarem Verhältnis gemischt und über Nacht bei 16°C in 20 mM Tris/Cl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 1 mM ATP inkubiert.

Folgende Methoden zur in vitro Rekombination von DNA wurden nach Maniatis et al. (78) durchgeführt: Verkürzung linearer DNA-Fragmente durch Nuklease Bal31; Auffüllen von überstehenden 5'-Enden von DNA-Fragmenten durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I; Phosphorylierung synthetischer Linkermoleküle mit Polynukleotidkinase; Anheftung der phosphorylierten Linkermoleküle an glattendige DNA-Fragmente durch T4 DNA-Ligase; Isolierung von DNA aus "low melting"-Agarose (Sigma, Typ VII); Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe von DNA-Fragmenten durch alkalische Phosphatase.

4. Transformation von Bakterien

E. coli Stämme und Salmonella typhimurium TA4325 wurden nach der Methode von Cohen et al. (22) transformiert.

5. In vitro Verpackung von Cosmid-DNA

Die in vitro Verpackung von rekombinanter Cosmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Verpackungsextrakten der Firma Boehringer, Mannheim. Die Verpackungsreaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6. In vitro Markierung von DNA-Fragmenten mit 32 Phosphat

a) Endmarkierung von DNA-Fragmenten

Dephosphorylierte, 5' überstehende Enden von DNA-Fragmenten wurden mittels T4 Polynukleotidkinase mit γ - 32 P-ATP (7 000 Ci/mmol) markiert (79). Die Markierung der 3'-Enden von DNA-Fragmenten mit überstehenden 5'-Enden erfolgte durch Inkubation mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und einem geeigneten α - 32 P-dNTP (3 000 Ci/mmol) sowie nicht markierten dNTP.

b) Nicktranslation

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mittels Nicktranslation durch die DNA-Polymerase I mit α - 32 P-dATP (3 000 Ci/mmol) erfolgte nach Maniatis et al. (78). Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe einer Sephadex G50-Säule abgetrennt.

7. DNA-DNA Hybridisierungen

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen aufgetrennt, denaturiert (109) und durch Vakuumblot auf Nitrocellulosefilter (Schleicher und Schüll, BA85) transferiert. Die Absättigung der Nitrocellulosefilter geschah durch Inkubation in 6 x SSC-Puffer (0.9 M NaCl, 0.9 M Na-Citrat, pH 7.2) mit 0.7 % Magermilchpulver (58). Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C für 18 Stunden im oben genannten Puffer, der 1 μ Ci/ml radioaktiv markierte DNA enthielt. Die Nitrocellulosefilter wurden in 2 x SSC-Puffer (0.3 M NaCl, 0.03 M Na-Citrat, pH 7.2) mit 0.1 % SDS und 0.25 % Magermilchpulver gewaschen, getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert.

8. DNA-Sequenzierung

a) Chemische Methode

Für die Sequenzierung mit der chemischen Methode wurden 5' oder 3' endmarkierte DNA-Fragmente mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease gespalten und in niedrigschmelzenden Agarosegelen aufgetrennt. Die nur an einem Ende markierten DNA-Fragmente wurden isoliert und in die basenspezifischen Modifizierungsreaktionen (79) eingesetzt. Die "A+G" spezifische Modifizierungsreaktion erfolgte nach Gray et al. (44).

b) Enzymatische Methode

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode (103) erfolgte mittels T7 DNA-Polymerase (Sequenase) der Firma United States Biochemical Corporation. Die Sequenzreaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide.

c) Sequenzgele

Die durch die Sequenzreaktionen erhaltenen Fragmente wurden in 6 %, 8 %, 20 % Polyacrylamidgelen, die 7 M Harnstoff enthielten, aufgetrennt. Alternativ wurden denaturierende 6 % Polyacrylamidgele mit einem kontinuierlichen Puffergradienten verwendet (Schnier, persönliche Mitteilung). Nach dem Auswaschen des Harnstoffs mit 10 % Essigsäure wurden die Gele getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert.

d) Computeranalyse der ermittelten Einzelsequenzen

Die ermittelten Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe eines Apple II europlus Mikrocomputers ausgewertet. Die verwendeten Programme waren "sequence analysis" Version 2.1 und

3.0 (69).

VIII. Physiologische Testreaktionen

1. Test auf FDH_N - und FDH_H -Aktivität

Auf Aktivität der FDH_N wurde durch anaerobe Bebrütung der Organismen auf MacConkey-Nitrat-Platten (4) getestet.

Auf Aktivität der FDH_H wurde mit Hilfe der Benzylviologen-Überschichtung (77) oder durch Test auf Gasbildung aus Glucose (Durhamröhrchen) (29) getestet.

2. Test auf Nitratreduktase-Aktivität

Zum Nachweis der Nitratreduktase-Aktivität wurden die Mulsygenen Stämme anaerob auf WM-Minimalmediumplatten mit 0.8 % Glycerin und 1 % K-Nitrat bei 30°C angezogen und das Wachstum mit dem des Wildtypstamms MC4100 verglichen. Zusätzlich wurden die Stämme auf Resistenz gegen Chlorat überprüft (4).

IX. Proteinchemische und enzymatische Methoden

1. Präparation zellfreier Extrakte und enzymatische Testreaktionen

a) Enzymtest für β -Galaktosidase

β -Galaktosidase wurde nach den Angaben von Miller (82) bestimmt. Dazu wurden die Kulturen in TGYEP-Medium pH 6.5 mit 10 μ M Na-Molybdat und 1 μ M Na-Selenit bis zu einer OD_{600} von 0.4 bis 0.5 angezogen.

b) Test auf Formiatdehydrogenase-Aktivität

Die Anzucht der Zellen (100 ml) erfolgte unter anaeroben Bedingungen in TGYES-Medium mit 10 μM Na-Molybdat und 1 μM Na-Selenit. Die Synthese der FDH_w wurde durch Zugabe von 1 % K-Nitrat induziert. Nach Erreichen einer OD_{420} von 0.7 wurden die Zellen anaerob geerntet und mit sauerstofffreiem 100 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.2 gewaschen. Sie wurden im gleichen Puffer resuspendiert und 15 min lang bei Raumtemperatur mit Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml inkubiert. Nach Zugabe von DNase in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ wurden die Zellen durch Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Der Enzymtest auf die Formiatdehydrogenase-Aktivität wurde unter N_2 -Atmosphäre bei Raumtemperatur, modifiziert nach Lester und DeMoss (72), durchgeführt.

Der Ansatz zur Bestimmung der FDH_w -Aktivität enthielt in einem Volumen von 2 ml, 100 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.2, 90 μM Dichlorphenolindophenol, 90 μM Phenazinmethosulfat und 20 μg Protein. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Na-Formiat in einer Endkonzentration von 36 mM gestartet.

Der Ansatz zur Bestimmung der FDH_s -Aktivität enthielt in einem Volumen von 2 ml, 100 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.2, 5 mM Benzylviologen und 100 μg Protein. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Na-Formiat in einer Endkonzentration von 36 mM gestartet.

c) Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Test

Die in LB bis zu einer OD_{420} von 1.0 angezogenen Zellen wurden in 50 mM Tris/Cl-Puffer mit 1 mM DTT gewaschen und in 2 Vol des selben Puffers resuspendiert. Der Aufbruch der Zellen geschah durch zwei Passagen durch die French Pressure Zelle (American Instruments Company) bei 18 000 psi. Zur Herstellung des ribosomenfreien S100-Extrakts wurde

zunächst für 30 min bei 30 000 x g und anschließend für 120 min bei 100 000 x g zentrifugiert.

Die Acylierung von tRNA mit ^{14}C - oder ^3H -Aminosäuren erfolgte nach der Methode von Kosakowski und Böck (65).

Der Standardacylierungstest enthielt, in einem Volumen von 0.25 ml, 100 mM Tris/Cl Puffer, 10 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 2 mM ATP, 1 mM DTT, 20 μM $\text{L}^{-1}\text{ }^{14}\text{C}$ -Aminosäure (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 100 μg Gesamt-tRNA und 50 - 100 μg Protein des S100-Extrakts. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min lang bei 28°C inkubiert. Die Gesamt-tRNA wurde unter diesen Bedingungen vollständig mit der jeweiligen Aminosäure verestert. Nach Beendigung der Enzymreaktion (0°C) wurde die Radioaktivität im durch Trichloressigsäure fällbaren Material bestimmt (65).

2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte nach Laemmli (68). Die Proteine wurden mit 0.2 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva) in 30 % Methanol und 10 % Essigsäure gefärbt.

3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (74) durchgeführt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Alternativ wurde auch die Methode von Whitaker und Granum (124) angewendet.

X. Expression plasmidkodierter Gene

Die Expression plasmidkodierter Gene erfolgte mit Hilfe des T7 RNA Polymerase/Promotor Systems (120).

1. Spezifische Markierung plasmidkodierter Genprodukte mit ^{35}S -Methionin

Die Anzucht der Zellen, die das Plasmid pGP1-2 und ein pT7-Plasmid enthielten, richtete sich nach den Angaben von S. Tabor (unveröffentlicht). Die Kultur wurde dazu in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin bei 30°C bis zu einer OD_{550} von 0.5 angezogen. Die Zellen von 1 ml der Kultur wurden geerntet und mit WM-Salzmischung gewaschen. Die Zellen wurden dann in 5 ml WM-Basalmedium mit 18 Aminosäuren (je 100 µg/ml, außer Cystein und Methionin) resuspendiert und für 60 min bei 30°C inkubiert. Die Expression der plasmidkodierten Gene durch Hitzeinduktion und die Markierung der Proteine mit ^{35}S -Methionin ($>800 \text{ Ci/mmol}$) erfolgten wie beschrieben (120). Danach wurden die Zellen durch Kochen in Probenpuffer (120) aufgebrochen und die erhaltenen Lysate in SDS-Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden mit Amplify (Amersham-Buchler, Braunschweig) behandelt, getrocknet und bei -70°C mit einem Röntgenfilm exponiert.

2. Überexpression plasmidkodierter Gene

Die Überexpression plasmidkodierter Gene wurde modifiziert nach der Methode von S. Tabor (unveröffentlicht) durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte dazu in einem gepufferten Vollmedium (2 % Trypton, 1 % Hefeextrakt, 0.8 % Glucose, 0.5 % NaCl, 0.2 % Glycerin, 100 mM K-Phosphat Puffer pH 7.2) mit Kanamycin und Ampicillin. Die Organismen wurden anaerob bei 30°C bis zu einer OD_{550} von 0.8 angezogen und dann für 20 min bei 45°C inkubiert. Die Zellen wurden noch weitere 60 min bei 37°C bebrütet und anschließend durch Zentrifugation geerntet.

XI. Dünnschicht-Chromatographie

Die Auftrennung von Aminosäuren mittels Dünnschicht-Chromatographie erfolgte auf Kieselgel 60 DC-Alufolien (Merck,

Darmstadt) mit 0.2 mm Schichtdicke. Das Fließmittel war ein Gemisch aus Äthanol und deionisiertem Wasser im Verhältnis 70:30 (v/v) (8). Für die Chromatographie wurde die aufsteigende Technik ohne Kammersättigung verwendet. Authentische Aminosäuren wurden mit Hilfe der Ninhydrinreaktion (32, 90) nachgewiesen.

XII. In vivo Markierung mit ^{75}Se -Selenit

1. Nachweis von Selenoproteinen

Die in vivo Markierung der Selenopolypeptide der Formiatdehydrogenasen wurde nach Cox et al. (25) durchgeführt. Die Zellen wurden dazu in TGYES-Medium pH 6.8 mit 10 μM Na-Molybdat anaerob unter N_2 -Atmosphäre angezogen. Die Synthese des Selenopolypeptids der FDH_M wurde durch 1 % K-Nitrat induziert. Radioaktives Na- ^{75}Se -Selenit (600 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) wurde in einer Endkonzentration von 1.5 μM zugegeben. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0.8 wurden die Zellen geerntet, mit 0.9 % NaCl gewaschen, in Probenpuffer aufgenommen und durch Kochen lysiert. Die Extrakte wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und bei -70°C mit Röntgenfilm und Verstärkerfolie (Curix MR 600) exponiert.

2. Nachweis von Selenocysteyl- tRNA_{Met}

a) In vivo Markierung und Isolierung aminoacylierter Gesamt-tRNA

Zur Markierung wurden die Kulturen in TGYEP-Medium pH 6.5 mit 0.8 % Glucose und 10 μM Na-Molybdat anaerob unter N_2 -Atmosphäre angezogen. Radioaktives Na- ^{75}Se -Selenit (600 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) wurde auf eine Endkonzentration von 1.5 μM zugegeben. Die Zellen (aus 4 ml Kultur einer OD_{600} von 1.0) wurden geerntet und in 0.1 M Na-Acetat Puffer mit 1 mM DTT gewaschen.

Der Zellaufschluß, die Isolierung der aminoacylierten Gesamt-tRNA und die Derivatisierung von ^{75}Se -Selenocystein erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Die gesammelten Zellen wurden dazu in 0.1 M Na-Acetat Puffer pH 4.6 resuspendiert und nach Zugabe von 1 Vol Phenol (äquilibriert mit 0.1 M Na-Acetat Puffer pH 4.6) aufgebrochen. Die RNA wurde extrahiert und aus 0.3 M Na-Acetat pH 4.6 mit Äthanol präzipitiert. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet.

b) Derivatisierungsreaktionen

- Derivatisierung nach vorheriger alkalischer Hydrolyse der Aminoacyl-tRNA-Esterbindung

Zur Hydrolyse der Aminoacyl-tRNA-Esterbindung wurde aminoacylierte Gesamt-tRNA aus 0.8 ml Zellen einer OD_{600} von 1.0 in 100 mM Tris/Cl Puffer pH 8.5 für 40 min bei 40°C inkubiert. Zur Derivatisierung wurde das Hydrolysat in einem Endvolumen von 5 μl entweder in 100 mM Tris/Cl Puffer pH 8.5 oder in einem Puffergemisch (75 mM Tris/Cl, 100 mM MES) pH 6.5 mit Jodacetamid, Jodacetat oder 4-Vinylpyridin in einer jeweiligen Endkonzentration von 5 mM im Dunkeln 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch zusammen mit entsprechend derivatisiertem, authentischem Selenocystein anaerob mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Das Chromatogramm wurde getrocknet und bei -70°C mit einem Röntgenfilm und Verstärkerfolie exponiert.

- Derivatisierung ohne vorherige alkalische Hydrolyse

Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 5 μl 100 mM HEPES Puffer pH 6.5, 5 mM Jodacetamid und aminoacylierte Gesamt-tRNA aus 0.8 ml Zellen einer OD_{600} von 1.0. Das Reaktionsgemisch wurde im Dunkeln für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann durch Dünnschicht-Chromatographie und Autoradiographie analysiert.

Alternativ zur Derivatisierung wurde nach der alkalischen Hydrolyse authentisches Selenocystein zum Hydrolysat in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Das Gemisch wurde dann durch Luft-Exposition zum Diselenid Selenocystin oxidiert und aerob mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt.

XIII. Derivatisierung von Selenocystein

Die Derivatisierung von Selenocystein erfolgte modifiziert nach beschriebenen Methoden (119).

Selenocystin (3 mM) wurde mit KBH_4 (1 mg/ml) bei pH 8.5 für 40 min bei 40°C reduziert. Zur vollständigen Abreaktion von KBH_4 wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Selenocystein wurde dann unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit eines zehnfachen Überschusses an Jodacetamid, Jodacetat oder 4-Vinylpyridin 20 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

XIV. In vitro Synthese von Selenocysteyl-tRNA_{AUC A}

Alle Experimente zur vitro Synthese von Selenocysteyl-tRNA_{AUC A} und die Präparation der dafür verwendeten zellfreien Extrakte wurden anaerob unter einer Atmosphäre von 96 % N_2 und 4 % H_2 durchgeführt.

1. Präparation der zellfreien Extrakte

Nach der Überexpression eines plasmidkodierten sel Gens in entsprechenden Stämmen wurden die anaerob angezogenen Zellen geerntet und in 50 mM HEPES Puffer pH 7.5 mit 1 mM DTT gewaschen. Die Zellen wurden in wenig HMPD-Puffer (50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgAc, 1 mM DTT, 15 μM Pyridoxal 5'-Phosphat) resuspendiert und mittels einer French Pressure Zelle (18 000 psi) aufgebrochen. Der Zellextrakt wurde für

60 min bei 100 000 x g zentrifugiert und dann einer Chromatographie über eine Sephadex G25-Säule (äquibriert mit HMPD-Puffer) unterzogen. Der so gewonnene S100/G25-Extrakt wurde bei -70°C aufbewahrt.

2. In vitro Umwandlung von Seryl-tRNA_{U C A} in Seleno-cysteyl-tRNA_{U C A}

Gesamt-tRNA wurde in einem ersten Schritt in vitro mit L-¹⁴C-Serin beladen. Der Acylierungstest enthielt, in einem Volumen von 1 ml, 100 mM Tris/Cl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 10 µM L-¹⁴C-Serin (100 µCi/µmol), 1 mg Gesamt-tRNA und 1 mg S100-Protein. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde die aminoacylierte Gesamt-tRNA zweimal mit Phenol (äquibriert mit 0.1 M Na-Acetat pH 4.6) extrahiert. Sie wurde aus 0.3 M Na-Acetat mit Äthanol präzipitiert und in 20 µl 0.02 M Na-Acetat pH 4.6 gelöst.

Das in vitro "Umwandlungsexperiment" wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Der Ansatz enthielt, in einem Volumen von 50 µl, 100 mM HEPES Puffer pH 7.5, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT, 9 µM Selen-Donor (Na-Selenit, Na-Selenid, Selenocystein), 50 µg mit ¹⁴C-Serin beladene Gesamt-tRNA (100 µCi/µmol) und 100 µg S100/G25-Extrakt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 28°C inkubiert. In Kontroll-experimenten wurde entweder kein Selen-Donor oder kein Extrakt zugegeben.

Alternativ wurde als Substrat Gesamt-tRNA verwendet, die mit nicht-radioaktivem L-Serin beladen war. In diesen Experimenten wurde dann Na-⁷⁵Se-Selenit in einer Endkonzentration von 9 µM zugegeben. Die spezifische Aktivität betrug 150 µCi/µmol.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol 0.1 M Na-Acetat-Puffer pH 4.6 und 2 Vol Phenol (äquibriert mit 0.1 M Na-

Acetat-Puffer pH 4.6) beendet. Die aminoacylierte tRNA wurde extrahiert, aus 0.3 M Na-Acetat mit Äthanol präzipitiert und in 4 µl 100 mM Tris/Cl pH 8.5 gelöst. Nach alkalischer Hydrolyse der Aminoacyl-tRNA-Esterbindung (40 min, 40°C) und Zugabe von authentischem Selenocystein (Endkonzentration: 1 mM) wurde das Gemisch an Luftsauerstoff oxidiert, aerob mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und autoradiographiert. Authentisches Selenocystin wurde mit Ninhydrin nachgewiesen.

XV. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen

Enzyme für Restriktion und Modifikation von DNA wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Pharmacia (Freiburg) und New England Biolabs (Schwalbach) erhalten.

Radioaktive Verbindungen wurden von New England Nuclear (Dreieich) oder Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

Chemikalien wurden von den Firmen Serva (Heidelberg), Sigma (München) oder Merck (Darmstadt) geliefert.

ERGEBNISSE

I. Isolierung und Charakterisierung von Mutanten mit defektem Selenstoffwechsel

1. Isolierung der Mutanten

E. coli bildet zwei selenierte Proteine, das 80 kDa Selenopolypeptid der FDH_H und das 110 kDa Selenopolypeptid der FDH_M (25). Die hohe Spezifität der Selenierung sowie die Tatsache, daß Selen in Form von Selenocystein cotranslational in die Polypeptidkette eingebaut wird (132), deuten auf eine Beteiligung mehrerer Komponenten am Selenierungsvorgang hin. Über die Isolierung von Mutanten sollten daher Gene identifiziert werden, deren Produkte am Selenierungsprozeß beteiligt sind. Da Selen für die Bildung aktiver Formiatdehydrogenasen (FDH_H und FDH_M) nötig ist (72), sollten diese Mutanten am Fehlen sowohl der FDH_M - als auch der FDH_H -Enzymaktivität zu erkennen sein.

Für die Mutagenese wurde der Phage Mu d1 (amp, lac) verwendet. Von einer Insertion des Phagen betroffene Gene werden inaktiviert, und es kommt zum Ausfall der entsprechenden Enzymaktivität. Als Rezipient diente *E. coli* MC4100, der bezüglich der FDH -Enzymaktivitäten und der Synthese von Selenopolypeptiden gut untersucht war (91, 92).

Mit Hilfe eines geeigneten Indikatormediums war es möglich, FDH_M -Mutanten zu identifizieren. Diese Mutanten häufen bei anaerober Bebrütung in Gegenwart von Nitrat das Stoffwechselprodukt Formiat an und scheiden es ins Medium aus. Sie

bewirken deshalb auf MacConkey-Nitrat-Agar den Umschlag des pH Indikators und bilden kleine dunkelrote Kolonien. Wildtypkolonien bleiben dagegen fast farblos und werden deutlich größer (4).

Nach Infektion des Stammes MC4100 mit einem Mu d1-Phagen-lysate wurden Mu-lysogene Stämme über Ampicillin-Resistenz selektiert. Nach anaerober Bebrütung auf MacConkey-Nitrat-Agar zeigten 125 Klone unter etwa 20 000 getesteten Kolonien einen FDH_H-negativen Phänotyp. Sie wurden gereinigt, nochmals getestet und weiter charakterisiert.

2. Charakterisierung der Mutanten

a) Test auf FDH_H-Phänotyp und intakten Molybdän-Stoffwechsel

Als erstes wurden die Mutanten mit FDH_H-negativem Phänotyp nun auf ihren FDH_H-Phänotyp überprüft. Dazu wurden sie auf anaerobe Gasbildung aus Glucose getestet. 75 der isolierten Mutanten konnten kein Gas aus Glucose bilden und wurden weiter charakterisiert (Abb. 1).

Da neben Selen auch Molybdän für die Bildung aktiver Formiatdehydrogenasen essentiell ist (72), wurde untersucht, ob der pleiotrope FDH-negative Phänotyp auf einem Defekt im Molybdän-Stoffwechsel beruht. Deshalb wurden diese Mutanten mit Hilfe von Plattentests auf Chloratresistenz bzw. auf anaerobes Wachstum mit Glycerin als alleiniger C-Quelle und Nitrat als Elektronenakzeptor getestet. 10 der pleiotropen Mutanten waren wie der Wildtypstamm MC4100 chloratsensitiv und konnten anaerob auf Glycerin/Nitrat-Medium wachsen. Die restlichen 65 Mutanten waren chloratresistent, FDH- und Nitratreduktase-negativ; sie wurden nicht weiter charakterisiert (Abb. 1).

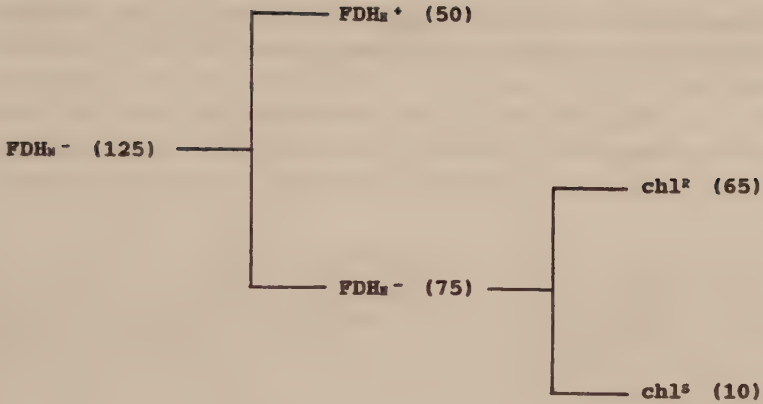


Abbildung 1:

Diagramm zur Charakterisierung der isolierten Mutanten über physiologische Testreaktionen.

Zahlen in Klammern bedeuten die Anzahl entsprechender Mutanten.

chl^R: chloratresistent

chl^S: chloratsensitiv

b) Einbau von Selen in FDH_N und FDH_S

Die zehn pleiotropen FDH-negativen Mutanten wurden mit Hilfe von ⁷⁵Se-Markierungsexperimenten auf Bildung von Selenopolypeptiden untersucht. Dazu wurden Kulturen anaerob in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Nitrat angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert.

Es wurde gefunden, daß alle Vertreter dieser Mutantenklasse Selen weder in das 110 kDa noch in das 80 kDa Selenopolypeptid einbauen konnten. Eine singuläre Mutation führt in diesen Mutanten also zum Ausfall der Selenierung beider

Polypeptide. Abbildung 2 zeigt das Autoradiogramm der Zellextrakte von vier ausgewählten Vertretern nach Elektrophorese auf 7.5 % SDS-Polyacrylamidgelen.

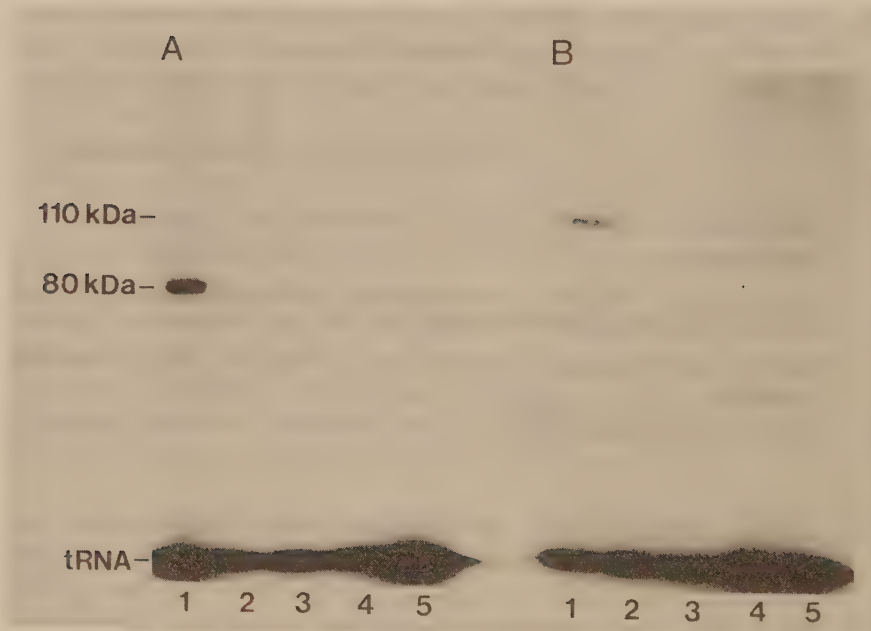


Abbildung 2:

Autoradiogramm von SDS-Extrakten ^{75}Se -Selenit markierter Zellen nach anaerober Anzucht ohne Nitrat (A) bzw. mit Nitrat (B).

Spuren: (1) MC4100, (2) WL1, (3) WL2, (4) WL5, (5) WL153

c) Test auf Formiatdehydrogenase-Aktivität

Kulturen von MC4100 und der Mutanten WL2 und WL153 wurden anaerob mit bzw. ohne Nitrat angezogen und die Aktivität der FDH_N wurde mit Benzylviologen, die Aktivität der FDH_M mit Phenazinmethosulfat als Elektronenakzeptoren bestimmt. Tabelle 3 zeigt die gemessenen Enzymaktivitäten.

Tabelle 3: Aktivität der FDH_N und FDH_M in MC4100 und den Mutanten WL153 und WL2

Stamm	Spezifische FDH -Aktivität ^a			
	FDH_N		FDH_M	
	-NO ₃	+NO ₃	-NO ₃	+NO ₃
WL2	0	0	0	0
WL153	0	0	0	0
MC4100	1.47	0.1	0.14	0.79

a) Die Aktivität ist in $\mu\text{Mol Formiat} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ angegeben.

Im Gegensatz zum Wildtyp MC4100 zeigten Extrakte der Mutanten keine FDH_N - und FDH_M -Aktivität. Der Defekt hat also den Ausfall der Enzymaktivitäten beider Formiatdehydrogenasen (FDH_N und FDH_M) zur Folge.

3. Charakterisierung von Mutanten mit beschriebenen Defekten in fdhA, fdhB und fdhC

Von Mandrand-Berthelot und Haddock (47) waren bereits ähnliche, pleiotrope Mutanten isoliert worden, die keine FDH-Enzymaktivität zeigen, in denen die Aktivitäten anderer Molybdoenzyme jedoch nicht betroffen sind. Die genetische Charakterisierung dieser Mutanten führte zur Beschreibung der Genloci fdhA, fdhB und fdhC. Von M.-A. Mandrand-Berthelot wurden uns freundlicherweise einige dieser Mutanten zur Untersuchung auf einen Defekt im Selenstoffwechsel zur Verfügung gestellt.

Kulturen von EMG29 (fdh'), GY01 (fdhA), MB08 (fdhB) und MB07 (fdhC) wurden dazu anaerob mit bzw. ohne Nitrat angezogen und mit ^{75}Se -Selenit markiert.

Wie das Autoradiogramm in Abbildung 3 zeigt, waren in den Extrakten der Mutanten GY01 und MB07 die markierten Banden des 80 kDa und des 110 kDa Selenopolypeptids nicht nachweisbar. Darüber hinaus fehlte in MB08 auch der Einbau von Selen in tRNA. Die Produkte der Gene fdhA, fdhB und fdhC sind also am Selenstoffwechsel in *E. coli* beteiligt. Im weiteren Verlauf der Arbeit (siehe Kapitel II) stellte sich heraus, daß der als fdhA bezeichnete Genort in Wirklichkeit zwei Gene beinhaltet, die beide essentiell für den Selenierungsprozeß sind. Sie wurden mit selA und selB bezeichnet. Die früher als fdhC und fdhB bezeichneten Gene wurden in selC und selD umbenannt.

Die Produkte der Gene selA, selB und selC sind nur für den Einbau von Selen in die Selenopolypeptide erforderlich. Das Genprodukt von selD dagegen ist für den Einbau von Selen sowohl in die Selenopolypeptide als auch in tRNA von Bedeutung.

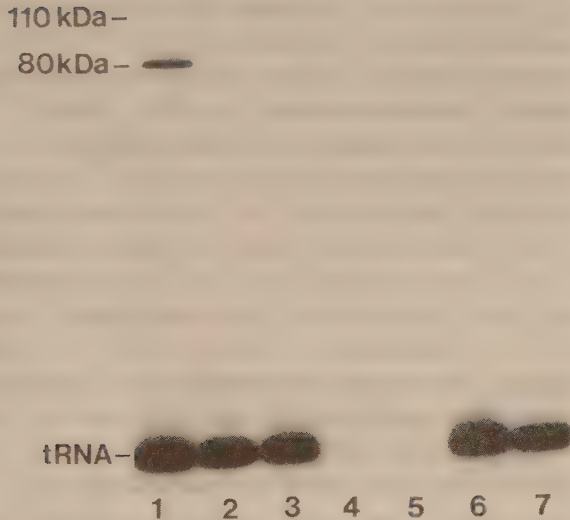


Abbildung 3:

Autoradiogramm elektrophoretisch aufgetrennter SDS-Zellysate von mit ^{75}Se -Selenit markierten Zellen nach anaerober Anzucht mit und ohne Nitrat.

- Spur 1: EMG29 (sel⁺) ohne Nitrat
- Spur 2: GY01 (selA) ohne Nitrat
- Spur 3: GY01 (selA) mit Nitrat
- Spur 4: MB08 (selD) ohne Nitrat
- Spur 5: MB08 (selD) mit Nitrat
- Spur 6: MB07 (selC) ohne Nitrat
- Spur 7: MB07 (selC) mit Nitrat

4. Einfluß von Mutationen im Selenstoffwechsel auf die Translation von fdhF-lacZ Genfusionen

Von Zinoni et al. (132) wurden plasmidkodierte fdhF-lacZ Genfusionen konstruiert, in denen die Expression von β -Galaktosidasehybriden vom Überlesen des internen UGA Codons des fdhF-Anteils abhängt. Mit Hilfe dieser fdhF-lacZ Genfusionen konnte gezeigt werden, daß die Δ (selAB) Mutante WL31153 aufgrund ihres Defekts im Selenstoffwechsel das UGA Codon in der fdhF mRNA nicht überlesen kann. Als Kontrolle wurden fdhF-lacZ Genfusionen mit mutiertem fdhF-Anteil verwendet, in denen das TGA Codon in fdhF gegen ein TCA (Serin-) Codon ausgetauscht ist. In diesen Genfusionen erwies sich die Translation als unabhängig von einem funktionellen selenierenden System (132). Die fdhF-lacZ Fusionsplasmide pFM54 (TGA) und pFM58 (TCA) wurden von F. Zinoni zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe dieser Plasmide wurde nun untersucht, ob Defekte in den Genen selC und selD ebenfalls einen Translationsstopp am UGA Codon der fdhF mRNA zur Folge haben. Dazu wurden die Plasmide pFM54 (TGA) und pFM58 (TCA) in die isogenen Stämme MB07 (selC), MB08 (selD) und EMG29 (sel⁺) transformiert. In anaerob gewachsenen Kulturen wurde dann die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt (Tab. 4).

Die Syntheserate des Fusionsproteins von pFM54 (TGA) war in den nicht selenierenden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp äußerst gering. Im Gegensatz dazu wurde das Fusionsprotein von pFM58 (TCA) in den nicht selenierenden Mutanten mindestens genauso stark exprimiert wie im Wildtyp EMG29.

Die Genprodukte von selC und selD sind also für das Überlesen des UGA Codons in der fdhF mRNA nötig.

Tabelle 4: Effizienz des Durchlesens von Codon₁₄₀ der fdhF-lacZ Fusionen in sel Mutanten

Stamm ^a	β -Galaktosidase ^b	
	pFM54 (TGA) ^c	pFM58 (TCA) ^c

EMG29 (<u>sel</u> ⁺)	925	1344
MB07 (<u>selC</u>)	13	1657
MB08 (<u>selD</u>)	10	1815

a) Anaerobe Anzucht bei 37°C in TGYEP mit Ampicillin

b) Einheiten spezifischer Aktivität nach Miller (1972)

c) Codon an Position der Aminosäure 140 in fdhF

II. Klonierung und Analyse der Gene selA und selB

Die verschiedenen identifizierten sel Gene wurden kloniert und sequenziert, um einen Einblick in die Primärstruktur der Genprodukte zu bekommen, die am Einbau von Selen in Proteine und tRNA beteiligt sind, und um dadurch möglicherweise Hinweise auf die Funktion zu erhalten.

1. Klonierungsstrategie, Stammkonstruktion und Anlegen einer Genbibliothek

Da gut charakterisierte sel Mutanten zur Verfügung standen, bot es sich an, eine Genbibliothek im Cosmidvektor pHC79 anzulegen und mit ihr die entsprechenden sel Gene über Komplementation zu identifizieren. Das Cosmid pHC79 ist ein Derivat von pBR322 und kodiert für Resistenz gegen Ampicillin und Tetracyclin (54). Das Tetracyclinresistenzgen wird durch das Einligieren von mit Sau3A erzeugten DNA-Fragmenten in die BamHI-Schnittstelle inaktiviert. Um auf Ampicillin-Resistenz selektieren zu können, war es erforderlich, einen ampicillinsensitiven Rezipientenstamm zu konstruieren (Abb. 4). Durch Exzision des Mu d1-Phagen aus WL153 (selB::Mu d1) entstand WL30153 (Δ selAB), in den mittels P1-Transduktion eine Δ recA Mutation eingeführt wurde. Das Derivat wurde mit WL31153 (Δ selAB Δ recA) bezeichnet.

Zur Erstellung einer Cosmidgenbibliothek wurde chromosomale DNA aus MC4100 mit dem Enzym Sau3A gespalten. DNA-Fragmente im Größenbereich von 30 kb wurden dann in den mit BamHI gespaltenen Cosmidvektor pHC79 ligiert. Die rekombinanten Cosmide wurden in vitro in λ -Phagenköpfe verpackt. Eine Titerbestimmung ergab, daß die erstellte Genbank ungefähr 9 000 rekombinante Cosmide enthielt. Für einen Klonierungsansatz wurden ca. 1 000 rekombinante Cosmide eingesetzt. Nach der Formel von Clarke und Carbon (19) sollte in 1 000

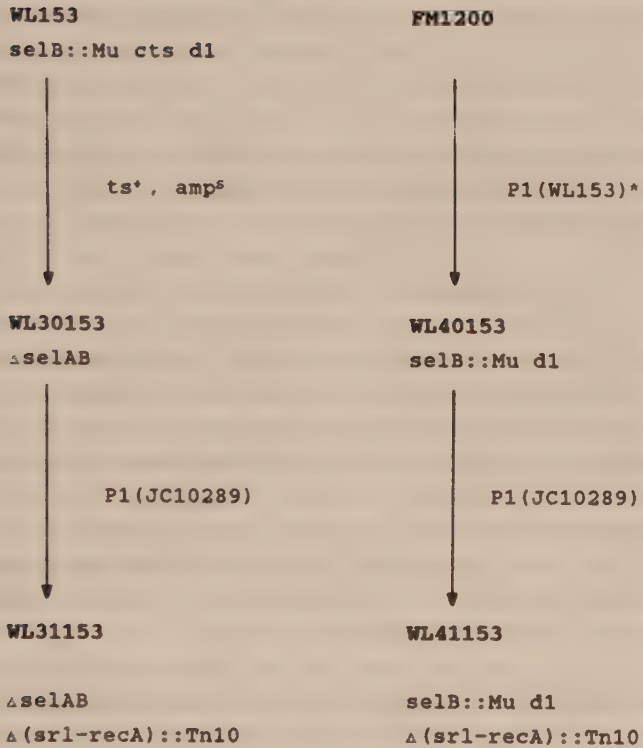


Abbildung 4:

Konstruktion von Rezipientenstämmen für die Klonierung von selA und selB.

ts': Wachstum bei 43°C
 amp^s: sensitiv gegen Ampicillin
 P1 (WL153)*: P1 Transduktion; Donor: temperaturresistente
 Derivate von WL153 (selB::Mu cts d1)
 P1 (JC10289): P1 Transduktion;
 Donor: JC10289 Δ(srl-recA)::Tn10

Cosmiden mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 30 kb das Genom von *E. coli* zweimal enthalten sein.

Als Indikatorreaktion für die Klonierung diente der von der FDH_w-Enzymaktivität erzeugte Kolonie-Phänotyp auf MacConkey-Nitrat-Platten. Alternativ dazu wurde auch die von der FDH_w katalysierte Reduktion von Benzylviologen (BV) durch Formiat (77) benutzt.

2. Klonierung von selA und selB

WL31153 (ΔselAB ΔrecA) wurde mit dem λ-Phagenlysate, das die Cosmidgenbank enthielt, infiziert. Nach 24 h Bebrütung unter N₂-Atmosphäre auf MacConkey-Nitrat-Platten zeigte einer unter ungefähr 800 cosmidhaltigen Klonen einen FDH_w-positiven Phänotyp. Dieser Klon konnte zudem wie der Wildtypstamm MC4100 Gas aus Glucose bilden. Aus diesem Klon wurde die Cosmid-DNA (pWL1) isoliert und in WL31153 retransformiert. Alle erhaltenen Transformanten zeigten FDH_w- und FDH_w-positiven Phänotyp.

Um möglichst einfach das komplementierende DNA-Fragment im ca. 30 kb großen Insert von pWL1 zu identifizieren, erschien es sinnvoll, die Subklonierung im Rahmen eines "Shotgun" Ansatzes durchzuführen. Da sich jedoch die Transformierbarkeit von WL31153 als zu niedrig erwies, wurde auf der Basis des gut transformierbaren Stammes FM1200 (F. Zinoni, persönl. Mitteilung) ein geeigneter Rezipientenstamm konstruiert (Abb. 4). Dazu wurde die Mu d1-Insertion aus WL153 (selB::Mu d1) in FM1200 transduziert. Als ΔrecA Derivat des erhaltenen Stammes WL40153 (selB::Mu d1) entstand WL41153 (selB::Mu d1 ΔrecA).

DNA des Cosmids pWL1 wurde mit dem Enzym Sau3A partiell gespalten, und die erhaltenen Fragmente wurden in das mit BamHI linearisierte Plasmid pACYC184 ligiert. Der Liga-

tionsansatz wurde in WL41153 (selB::Mu d1 Δ recA) transformiert. Die Transformanten wurden über Chloramphenicol-Resistenz selektiert.

Nach 24-stündiger Inkubation unter N₂-Atmosphäre wurden die Kolonien mit BV-Agar überschichtet. Sechs von etwa 2 000 Transformanten waren BV-positiv und färbten sich tiefblau. Plasmid-DNA dieser Klone wurde isoliert und mit Restriktionsenzymen physikalisch kartiert. Die komplementierenden Plasmide enthielten unterschiedlich große, überlappende Sau3A Insert-Fragmente. Zwei repräsentative Plasmide (pWL101, pWL107) wurden für die weiteren Experimente ausgewählt (Abb. 5). Das Plasmid pWL101 enthält ein 4.0 kb Sau3A Fragment, das Plasmid pWL107 ein 5.5 kb Sau3A Fragment chromosomaler DNA aus MC4100.

3. Komplementationsanalyse und Subklonierung des selA Gens

Für die Komplementationsanalyse des Cosmids pWL1 und seiner Subklone pWL101 und pWL107 waren im Rahmen der Klonierung zwei unterschiedliche Rezipientenstämme verwendet worden. Aus diesem Grund wurden die Plasmide pWL101 und pWL107 nun sowohl in WL41153 als auch in WL31153 auf Komplementation getestet (siehe Abb. 6). Wie erwartet, konnten beide Plasmide (pWL101, pWL107) die Mutante WL41153 (selB::Mu d1) komplementieren. Nur das Plasmid pWL107 war jedoch in der Lage, den Defekt von WL31153 (Δ selAB) zu komplementieren. Das unterschiedliche Verhalten der Rezipientenstämme ließ vermuten, daß bei der Konstruktion von WL31153 (Δ selAB) durch die Exzision des Mu-Phagen in WL153 (selB::Mu d1) zwei chromosomal benachbarte sel Gene deletiert worden waren.

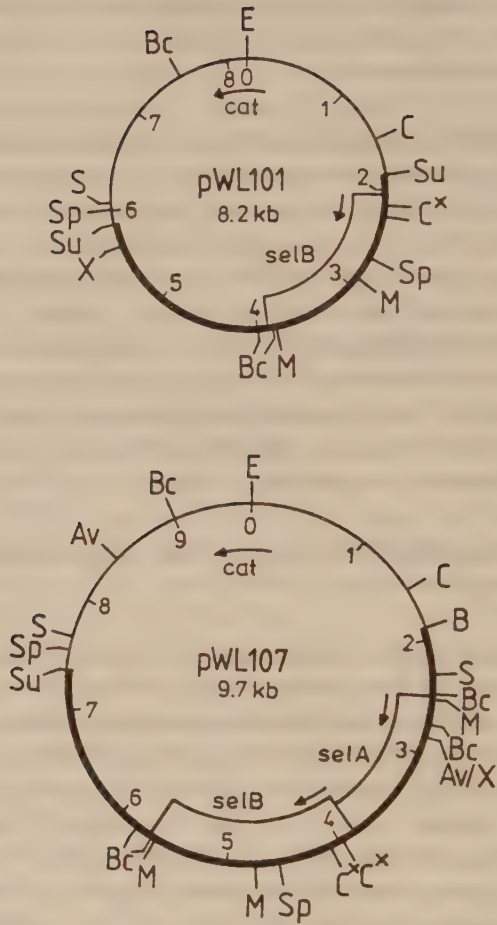


Abbildung 5:

Restriktionskarten der Plasmide pWL101 und pWL107.

Dünne Linie: Anteil des Vektors pACYC184

Starke Linie: Insert chromosomaler DNA

Als nächstes wurde daher durch Subklonierung untersucht, ob sich auf dem Insert von pWL107 zwei verschiedene sel Gene befinden. Da das Insert von pWL107 an einer Flanke weiter reicht als das Insert von pWL101, wurde ein 1.7 kb SalI/ClaI Fragment aus pWL107 in das entsprechend gespaltene Plasmid pBR322 kloniert. Das erhaltene Plasmid pWL170 wurde dann allein oder zusammen mit dem kompatiblen Plasmid pWL101 in WL31153 (Δ selAB) auf Komplementation getestet (Abb. 6). Das Plasmid pWL170 konnte die Deletion von WL31153 nicht allein, sondern nur zusammen mit pWL101 komplementieren. Um untersuchen zu können, ob das 1.7 kb SalI/ClaI Fragment aus pWL107 die Mutante WL41153 (selB::Mu d1) komplementieren kann, wurde dieses Fragment in den Plasmidvektor pACYC184 (gespalten mit ClaI und SalI) umkloniert (pWL171). Die Komplementationsanalyse ergab, daß der Defekt in WL41153 (selB::Mu d1) durch pWL171 nicht komplementierbar war.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, daß die Deletion von WL31153 wahrscheinlich zwei verschiedene, chromosomal benachbarte sel Gene betrifft. Der endgültige Beweis für zwei benachbarte sel Gene konnte dann durch die DNA-Sequenzanalyse erbracht werden (siehe Kapitel II.6.). Diese Gene wurden mit selA und selB bezeichnet.

Wie eine Komplementationsanalyse mit weiteren sel Mutanten ergab, wiesen WL2, WL5, WL6 und WL14 einen Defekt in selA auf, der durch pWL171 (selA⁺), nicht aber durch pWL101 (selB⁺) aufgehoben wurde (Abb. 6). Das umgekehrte Komplementationsmuster zeigten neben WL153 noch die Mutanten WL1, WL40 und WL98 mit einem Defekt in selB. Auch die zwei fdhA Mutanten GY01 und GY12, die von M.-A. Mandrand-Berthelot zur Verfügung gestellt wurden, ließen sich entweder durch pWL171 oder pWL101 komplementieren. Die Mutationen aller dieser Mutanten wurden wie erwartet durch das Plasmid pWL107 komplementiert.

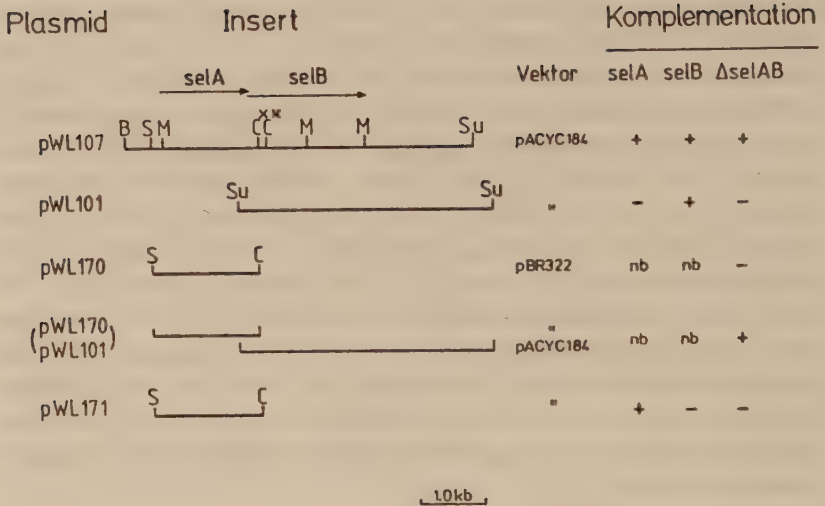


Abbildung 6:

Komplementationsanalyse mit den klonierten Genen selA und selB.

Die Transformanten wurden auf FDH_N -Aktivität (anaerobe Gasbildung aus Glucose) und FDH_H -Aktivität (Kolonie-Phänotyp auf MacConkey-Nitrat-Platten) getestet.

selA Mutanten: WL2, WL5, WL6, WL14, GY01

selB Mutanten: WL1, WL40, WL98, WL153, GY12

Δ selAB Mutante: WL31153

4. Analyse des Seleninbaus

Die Frage, ob in der Mutante WL31153 in Anwesenheit der plasmidkodierten Gene sela und selB der Einbau von Selen in die Polypeptide der FDH_M und FDH_S wieder erfolgt, wurde durch ein ⁷⁵Se-Markierungsexperiment beantwortet.

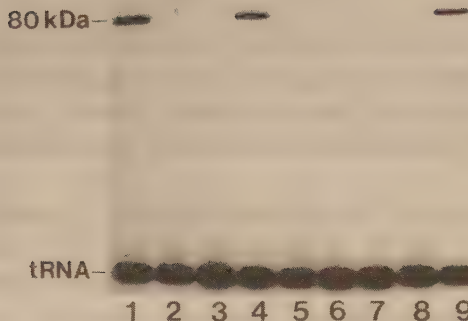
Dazu wurden Zellen von WL31153 (Δ selAB), transformiert mit den Cosmiden pH79 und pWL1 (sela⁺, B⁺) und mit den Plasmiden pWL170 (sela⁺), pWL101 (selB⁺), pWL107 (sela⁺ B⁺), pACYC184 und pBR322, anaerob angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Als Referenzstamm diente MC4100 (sel⁺). Wie das Autoradiogramm in Abb. 7 A zeigt, konnte neben MC4100 auch WL31153/pWL1 und WL31153/pWL107 Selen in das 80 kDa Polypeptid einbauen. Im Gegensatz dazu wurde von WL31153 in Anwesenheit der Plasmide pACYC184, pBR322, pWL170 bzw. pWL101 kein markiertes Selenopolypeptid gebildet. Auch das 110 kDa Polypeptid wurde in Anwesenheit von Cosmid pWL1 und Plasmid pWL107 wieder synthetisiert (siehe Abb. 7 B).

5. Eingrenzung des selB Gens durch Konstruktion von Bal31-Deletionsklonen

Um den DNA-Bereich des 4.0 kb Inserts von pWL101 einzugrenzen, in dem sich selB befindet, wurden mit Hilfe der Exonuklease Bal31 Deletionsklone konstruiert. Dazu wurde das Insert von pWL101 in zwei Ansätzen von jeweils einem Ende her verkürzt. Das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 8 zu sehen.

Im ersten Ansatz wurde Plasmid-DNA von pWL101 mit SalI linearisiert und durch Exonuklease Bal31 verkürzt. Nach dem Auffüllen der 5' überstehenden Enden mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurden SalI-Linker anligiert.

A



B

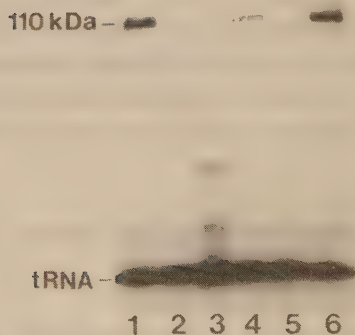


Abbildung 7:

Autoradiogramm von SDS-Extrakten ^{70}Se -Selenit markierter Zellen nach anaerober Anzucht ohne Nitrat (A: 10 % SDS-Polyacrylamidgel) bzw. mit Nitrat (B: 7.5 % SDS-Polyacrylamidgel).

A. Spur 1:	MC4100 (sel ⁺)	B. Spur 1:	MC4100
Spur 2:	WL31153	Spur 2:	WL31153
Spur 3:	WL31153/pHC79	Spur 3:	WL31153/pHC79
Spur 4:	WL31153/pWL1	Spur 4:	WL31153/pWL1
Spur 5:	WL31153/pBR322	Spur 5:	WL31153/pACYC184
Spur 6:	WL31153/pWL170	Spur 6:	WL31153/pWL107
Spur 7:	WL31153/pACYC184		
Spur 8:	WL31153/pWL101		
Spur 9:	WL31153/pWL107		

Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit EcoRI und Sali gespalten und durch präparative Gelelektrophorese von überschüssigen Linkermolekülen abgetrennt.

Um das durch die EcoRI-Spaltung geteilte Chloramphenicol-Resistenzgen (cat) im Vektoranteil von pWL101 wieder zu rekonstituieren, wurden die verkürzten EcoRI/Sali DNA-Fragmente mit dem entsprechenden 2.1 kb EcoRI/Sali Fragment von pACYC184 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in DH1 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Chloramphenicol-Resistenz.

Aus 24 Transformanten wurde Plasmid-DNA isoliert. Die ausgewählten Plasmide und die Ergebnisse der Komplementationsanalyse in WL41153 (selB::Mu d1) sind in Abbildung 9 A zusammengefaßt. In allen Plasmiden außer pWL145 war das selB Gen noch intakt.

Im zweiten Ansatz wurde Plasmid-DNA von pWL101 mit ClaI linearisiert und durch Exonuklease Bal31 verkürzt (Abb. 8). Nach dem Auffüllen der 5' überstehenden Enden wurden ClaI-Linker anligiert. Die DNA-Fragmente wurden mit EcoRI und ClaI gespalten und durch präparative Gelelektrophorese aufgetrennt. Die verkürzten EcoRI/ClaI Fragmente wurden schließlich mit dem 1.5 kb EcoRI/ClaI Fragment aus pACYC184 ligiert und in DH1 transformiert. Die Selektion erfolgte wiederum auf Chloramphenicol-Resistenz.

Die Komplementationsanalyse der ausgewählten Plasmide in WL41153 (selB::Mu d1) ergab (Abb. 9 B), daß lediglich pWL150 für ein enzymatisch noch aktives SelB Protein kodieren konnte. Alle weiter verkürzten Plasmide waren nicht mehr zur Komplementation von WL41153 befähigt.

Durch die Ergebnisse dieser Ansätze konnte also das selB Gen auf einem etwa 2.0 kb großen DNA-Fragment lokalisiert werden.

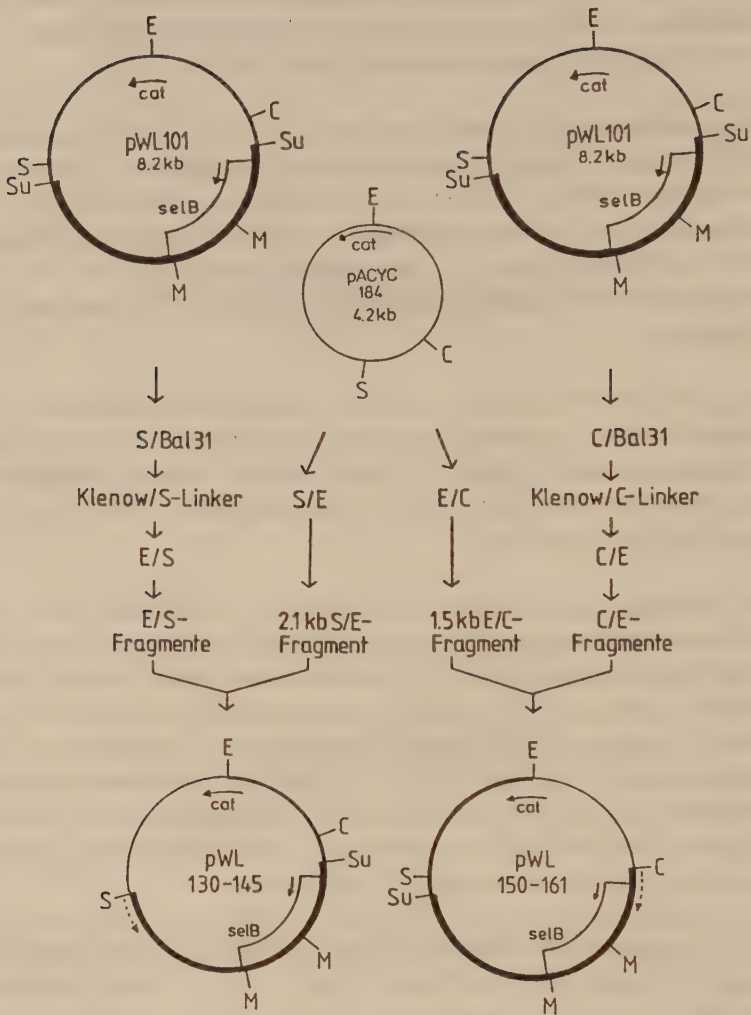
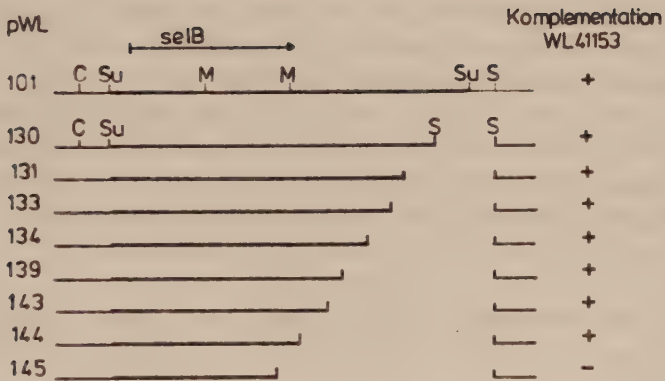


Abbildung 8:

Eingrenzung des *selB* Gens durch Verkürzung mit Exonuklease Bal31.

A



B

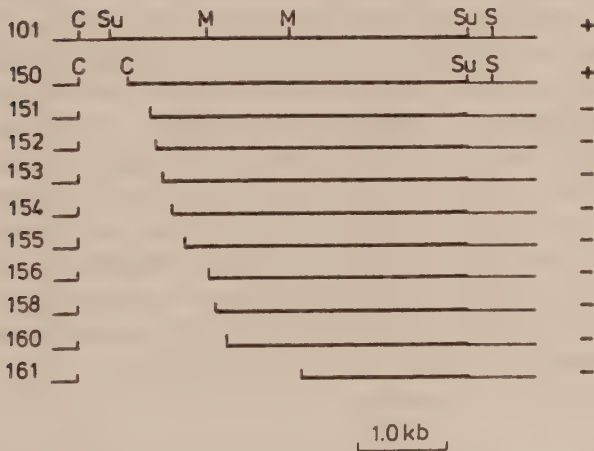


Abbildung 9:

Restriktionskarten von Plasmiden mit 3' (A) und 5' (B) terminalen Deletionen in selB und Komplementationsanalyse der Plasmide in WL41153 (selB::Mu d1).

6. Sequenzierung der Gene selA und selB

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz der Gene selA und selB erfolgte nach der Methode von Maxam und Gilbert (79). Insgesamt wurden über eine Länge von ca. 4 000 bp beide DNA-Stränge sequenziert. Für die Sequenzanalyse wurden auch die Bal31-Deletionsklone von pWL101 verwendet. Die Sequenzierungsstrategie und die für die Markierung verwendeten Restriktionsstellen sind in Abbildung 10 dargestellt. Die ermittelte Sequenz ist in Abbildung 11 gezeigt.

Durch Computeranalyse wurden zwei große offene Leserahmen gefunden.

Der Leserahmen von selA beginnt mit einem ATG Codon an Position 529-531 und endet mit einem TGA Codon an Position 1918-1920. Er kodiert für ein Protein mit 463 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 50.6 kDa entspricht. 6 Basenpaare stromaufwärts vor dem ATG Startcodon befindet sich eine mögliche Ribosomenbindestelle (116) mit der Sequenz AGG. Der offene Leserahmen von selB erstreckt sich von einem ATG Codon an Position 1917-1919 bis zu einem TAA Codon an Position 3759-3761. Er kodiert für ein Protein mit dem Molekulargewicht von 68.8 kDa, bestehend aus 614 Aminosäuren. Als mögliche Ribosomenbindestelle befindet sich 11 bp stromaufwärts vor dem ATG Startcodon von selB die Sequenz GGAG. Die offenen Leserahmen beider Gene überlappen um 1 Basenpaar.

E. coli-typische Promotorsequenzen (98, 2) konnten weder in dem 5' flankierenden DNA-Bereich vor selA noch vor selB identifiziert werden. Dem Ende des offenen Leserahmens von selB folgen palindrome Sequenzen, die rho-unabhängige Terminationsstellen für die Transkription darstellen könnten (98).

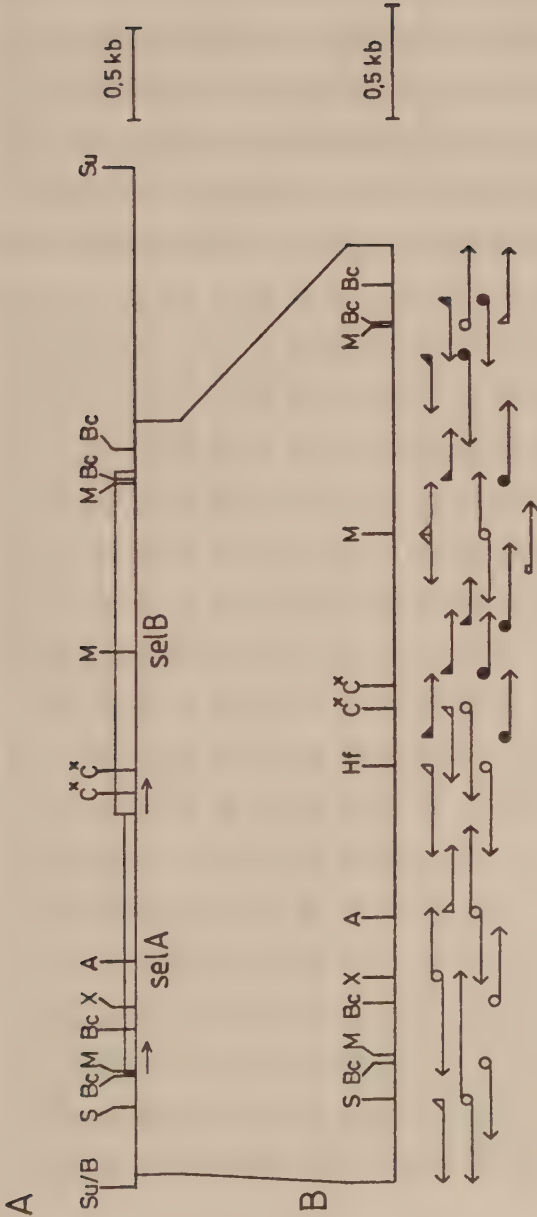


Abbildung 10:

Strategie zur Sequenzierung der Gene *selA* und *selB*.

Restriktionskarte (A) und sequenzierter Bereich (B) des *Sau3A* Inserts des Plasmids pWL107. 5'-Markierungen sind durch Dreiecke, 3'-Markierungen sind durch Kreise gekennzeichnet. Ausgefüllte Symbole bezeichnen Markierungen an *Cla*I bzw. *Sal*I Schnittstellen von Bal31 Deletionsklonen (siehe Abb. 9). Ein Quadrat bedeutet Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode (103).

1
GCACCGACATCCACCGGTGAATTA AAAACGCCAGCTACCCCGGTGACAAAGGTAAACTCTCATTACGATCCGCTGCAG

81
TCGTGCGGGTGCACAAATTGAGGCACTGGCGGATGCGATTATCGATGCCGGGTGCTATCGGTGCGTGAACAGGCGCC

161
TCCAGCGGCGCAGCAGTCTGAAGATGAATTGTTACGCCAGCGGGAGAAAATCAACCGCAGTCTGGATGTGCTGGAAGGAT

241
ATCTGGTCGATGGCACACTCAAACCGATACGGTCAATCTGGCGACTATCGCCATTGCCTGTGCCGTGCGATATCTCAAT

321
TTCGCGCGCGTTCGCCACGGTGGTGCTGCGACGCCACACTTAGTCAAACCTGGTCGAAAACCTGTTTAGCGCGCAAAAG

401
TTTTGCTCGCACCGCAACCGCCAAAGGCTTCGATGCCGGATATGCTCCTGACCCATCTCACGTTACAATCCGTGCTTATG

481
TATAACCGCCCTTCTCGGTGTCAGAGGGGCTTGATCAGCCAGGTTTCTCT Met Thr Thr Glu Thr Arg Phe Leu
ATG ACA ACC GAA ACG CGT TTC CTC

553
Tyr Ser Gln Leu Pro Ala Ile Asp Arg Leu Leu Arg Asp Ser Ser Phe Leu Ser Leu Arg
TAT AGT CAA CTT CCG GCT ATT GAT CCG TTA TTC CGC GAT ACG TCC TTC CTT TCT TTG CGT

613
Asp Thr Tyr Gly His Thr Arg Val Val Glu Leu Leu Arg Gln Met Leu Asp Glu Ala Arg
GAT ACT TAT GGT CAC ACC CGC GTG GTG GAA TTG TTG CCG CAG ATG CTC GAC GAA GCG CGA

673
Glu Val Ile Arg Gly Ser Gln Thr Leu Pro Ala Trp Cys Glu Asn Trp Ala Gln Glu Val
GAA GTG ATT CGT GGC ACC CAG ACG CTG CCT GCG TGG TGT GAA AAC TGG GCG CAA GAA GTC

733
Asp Ala Arg Leu Thr Lys Glu Ala Gln Ser Ala Leu Arg Pro Val Ile Asn Leu Thr Gly
GAT GCC CGG TTG ACG AAA GAA GCG CAG AGC GCG CTG CGT CCG GTG ATC AAC CTG ACC GGA

793
Thr Val Leu His Thr Asn Leu Gly Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ala Ala Val Glu Ala Val
ACC GTG CTG CAT ACC AAC CTT GCG CGA GCT TTA CAG GCG GAA GCC GCG GTG GAA GCC GTT

853
Ala Gln Ala Met Arg Ser Pro Val Thr Leu Glu Tyr Asp Leu Asp Asp Ala Gly Arg Gly
GCG CAG GCT ATT CGT TCG CCA GTG ACC CTC GAG TAT GAT CTG GAC CAG GCC GGA CCG GGA

913
His Arg Asp Arg Ala Leu Ala Gln Leu Leu Cys Arg Ile Thr Gly Ala Glu Asp Ala Cys
CAT CGC GAT CCG GCG CTG GCG CAG CTG CTG TGC CGT ATT ACG GGG GCG GAA GAT GCC TGT

973
Ile Val Asn Asn Asn Ala Ala Ala Val Leu Leu Met Leu Ala Ala Thr Ala Ser Gly Lys
ATC CTC AAT AAC AAT GCG GCG GCG GTG TTA TTG ATG TTG GCG GCC ACT GCG AGC GGA AAA

1033
Glu Val Val Val Ser Arg Gly Glu Leu Val Glu Ile Gly Gly Ala Phe Arg Ile Pro Asp
GAG GTG CTG GTA TCT CCG GCG GAA CTG GTG GAG ATT GGC GCG GCG TTT CGT ATT CCC GAT

1093
Val Met Arg Gln Ala Gly Cys Thr Leu His Glu Val Gly Thr Thr Asn Arg Thr His Ala
GTT ATG CGT CAG GCA GGC TGC ACC CTA CAC GAA GTA GGG ACC ACC AAC CCG ACC CAC GCG

1153
Asn Asp Tyr Arg Gln Ala Val Asn Glu Asn Thr Ala Leu Leu Met Lys Val His Thr Ser
AAT GAT TAT CGT CAG GCG GTG AAT GAA AAT ACC GCA CTG TTG ATG AAA GTA CAT ACC AGT

1213
Asn Tyr Ser Ile Gln Gly Phe Thr Lys Ala Ile Asp Glu Ala Glu Leu Val Ala Leu Gly
AAC TAC ACG ATT CAG GGG TTC ACC AAA GCG ATA GAT GAA GCG GAA CTG GTG GCG CTC GCG

1273
Lys Glu Leu Asp Val Pro Val Val Thr Asp Leu Gly Ser Gly Ser Leu Val Asp Leu Ser
AAA GAG CTG GAT GTT CCC GTA GTG ACT GAT TTA GCG AGT GCG TCG GTG GTG CAT ACC GCG

1333
Gln Tyr Gly Leu Pro Lys Glu Pro Met Pro Gln Glu Leu Ile Ala Ala Gly Val Ser Leu
CAG TAC GGT TTG CCG AAA GAG CCA ATG CCG CAG GAG TTG ATT CCG GCG GCG CTC AGT CTG

1393
Val Ser Phe Ser Gly Asp Lys Leu Leu Gly Gly Pro Gln Ala Gly Ile Ile Val Gly Lys
GTG AGT TTC TCC GCG GAC AAG TTG TTA GCG GCG CAG GCA GGA ATT ATT GTT GGT AAA

1453
Lys Glu Met Ile Ala Arg Leu Gln Ser His Pro Leu Lys Arg Ala Leu Arg Ala Asp Lys
AAA GAG ATG ATC GCC GCG CTC CAA AGC CAC CCG CTG AAG CGT GCA TTA CCG CCG GAT AAA

1513
Met Thr Leu Ala Ala Leu Glu Ala Thr Leu Arg Leu Tyr Leu His Pro Glu Ala Leu Ser
ATG ACC CTC GCG GCG CTG GAA GCC ACG TTG CGT CTT TAT TTA CAC CCT GAA GCT CTG AGT

1573
Glu Lys Leu Pro Thr Leu Arg Leu Leu Thr Arg Ser Ala Glu Val Ile Gln Ile Gln Ala
CAA AAA TTA CCG ACC CTG CGC CTG CTT ACC CGC AGC GCA GAG GTC ATT CAA ATC CAG GCA
1633
Gln Arg Leu Gln Ala Pro Leu Ala Ala His Tyr Gly Ala Glu Phe Ala Val Gln Val Met
CAA CGT TTA CAG GCC CCC CTT GCC GCA CAT TAC GGC GCG GAG TTT GCG GTA CAC GTT ATG
1693
Pro Cys Leu Ser Gln Ile Gly Ser Gly Ser Leu Pro Val Asp Arg Leu Pro Ser Ala Ala
CCA TGT CTT TCG CAG ATT GGC AGT GGT TCG CTG CCG GTT GAT CGC CTG CCG AGC GCG GCA
1753
Leu Thr Phe Thr Pro His Asp Gly Arg Gly Ser His Leu Glu Ser Leu Ala Ala Arg Trp
TTA ACG TTT ACA CCC CAT GAT GGA CGC GGT AGC CAC CTT GAG TCA TTA GCC GCC CGC TGG
1813
Arg Glu Leu Pro Val Pro Val Ile Gly Arg Ile Tyr Asp Gly Arg Leu Trp Leu Asp Leu
CGT GAA TTC CCA GTG CCG GTG ATT GGT CGT ATT TAT GAC GGA CGA TTG TGG CTG GAT TTA
1873
Arg Cys Leu Glu Asp Glu Gln Arg Phe Leu Glu Met Leu Leu Lys S S S
CGC TGC CTT GAA GAT GAG CAA CGG TTT TTT GAG ATG TTG TTG AAA T G ATT ATT GCG ACT
H e t Ile Ile Ala Thr
1932
GCC CGA CAC GTT GAC CAC GGC AAA ACA ACC TTA TTG CAG GCG ATT ACT GGC GTA AAT GCT
Ala Gly His Val Asp His Gly Lys Thr Thr Leu Leu Gln Ala Ile Thr Gly Val Asn Ala
1992
GAC CGT CTG CCG GAA GAA AAA AAG CGC GGC ATG ACC ATC GAT CTC GGC TAT GCC TAC TGG
Asp Arg Leu Pro Glu Glu Lys Arg Gly Met Thr Ile Asp Leu Leu Gly Tyr Ala Tyr Trp
2052
CCG CAG CCG GAT GGT CCG GTG CCT GGT TTT ATC GAC GTT CCC GGT CAT GAA AAG TTT CTT
Pro Gln Pro Asp Gly Arg Val Pro Gly Phe Ile Asp Val Pro Gly His Glu Lys Phe Leu
2112
TCC AAC ATG CTG GCG GGC GTT GGT GGT ATC GAT CAC GCG CTG TTG GTG GTG GCG TGC GAT
Ser Asn Met Leu Ala Glu Lys Val Thr Gly Ile Asp His Ala Leu Val Val Ala Cys Asp
2172
GAC GGC GTG ATG GCA CAG ACC CGT GAG CAT CTG GCG ATT TTG CAG CTG ACC GGT AAC CCG
Asp Gly Val Met Ala Gln Thr Arg Glu His Leu Ala Ile Leu Gln Leu Thr Gly Asn Pro
2232
ATG CTG ACA GTG GCG CTG ACC AAA GCG GAT CGC GTG GAC GAA GCG CGT GTT GAT GAG GTT
Met Leu Thr Val Ala Leu Thr Lys Ala Asp Arg Val Asp Glu Ala Arg Val Asp Glu Val
2292
GAA CGC CAG GTA AAG GAG GTT CTG CCG GAA TAC GGT TTT GCT GAG GCA AAA CTG TTT ATC
Glu Arg Gln Val Lys Glu Val Val Thr Gly Phe Ala Glu Tyr Gly Phe Ala Lys Leu Phe Ile
2352
ACC GCA GCA ACC GAA GGT CCG GGA ATG GAT GCC CTG CCG GAG CAT CTG CTT CAG TTG CCG
Thr Ala Ala Thr Glu Gly Arg Glu Met Asp Ala Leu Arg Glu His Leu Leu Gln Leu Pro
2412
GAA CGC GAG CAC GCC AGC CAA CAT AGT TTC CGC CTC GCG ATT GAC CCG GCA TTT ACC GTA
Glu Arg Glu His Ala Ser Gln His Ser Phe Arg Leu Ala Ile Asp Arg Ala Phe Thr Val
2472
AAA GGT GCC GGG CTG GTC GTC ACC GGT ACG GCG TTA AGC GGG GAA GTG AAG GTA GCG GAT
Lys Gly Ala Gly Leu Val Val Thr Gly Thr Ala Leu Ser Gly Glu Val Lys Val Gly Asp
2532
TCA CTC TGG CTG ACT GGT GTA AAT AAA CCG ATG CGT GTA CGT CCG CTG CAT GCG CAA AAC
Ser Leu Trp Leu Thr Gly Val Asn Lys Pro Met Arg Val Arg Ala Leu His Ala Gln Asn
2592
CAG CCA ACA GAA ACC GCG AAT GCC GGG CAG CGT ATC GCG CTT AAC ATC GCG GGT GAT GCG
Gln Pro Thr Glu Thr Ala Asn Ala Gly Gln Arg Ile Ala Leu Asn Ile Ala Gly Asp Ala
2652
GAA AAA GAG CAG ATT AAC CGT GGC GAC TGC CTG CTT GCC CAT GTG CCG CCA GAG CCG TTC
Glu Lys Glu Gln Ile Asn Arg Gly Asp Trp Leu Leu Ala Asp Val Pro Pro Glu Pro Phe
2712
ACA CCG GTG ATT GTC GAG CTT CAA ACC CAT ACA CCG CTG ACC CAG TGG CAG CCG CTG CAT
Thr Arg Val Ile Val Glu Leu Gln Thr His Thr Pro Leu Thr Gln Trp Gln Pro Leu His
2772
ATT CAC CAC GCC GCC AGC CAC GTC ACG GCA CGC GTT TCA CTG CTG GAA GAT AAC CTT GCT
Ile His His Ala Ala Ser His Val Thr Gly Arg Val Ser Leu Glu Asp Asn Leu Ala
2832
GAA CTG GTC TTC CAC ACC CCG TTA TGG CTG GCA GAT AAC GAC CCG CTG GTA TTG CCG GAT
Glu Leu Val Phe Asp Thr Pro Leu Trp Leu Ala Asp Asn Asp Arg Leu Val Leu Arg Asp
2892
ATC TCT GCC CCG AAC ACG CTG GCC GGA GCG CCG GTC GTG ATG CTT AAC CCG CCG CGT CCG
Ile Ser Ala Arg Asn Thr Leu Ala Gly Ala Arg Val Val Met Leu Asn Pro Pro Arg Arg
2952
GGT AAA CGT AAG CCG GAA TAT CTG CAA TGG CTG CCG TCT CTT GCA CCG CCG CAG ACC GAT
Gly Lys Arg Lys Pro Glu Tyr Leu Gln Trp Leu Ala Ser Leu Ala Arg Ala Gln Ser Asp

3012
GCC GAT GCG TTA TCT GTT CAT CTG GAA GCG GCG GCG GTT AAC CTT GCG GAT TTC GCC TCG
Ala Asp Ala Leu Ser Val His Leu Glu Arg Gly Ala Val Asn Leu Ala Asp Phe Ala Trp
3072
GCG GCG CAG CTC AAC GGC GAA GGG ATG GCG GAA TTG CTG CAA CAG CCT GGT TAT ATT CAG
Ala Arg Gln Leu Asn Gly Glu Gly Met Arg Glu Leu Leu Gln Gln Pro Gly Tyr Ile Gln
3132
GCT GGT TAT AGC TTG TTG AAT GCG CCG GTT GCC GCC CCG TGG CAG CCG AAA ATT CTC GAC
Ala Pro Tyr Ser Leu Leu Asn Ala Pro Val Ala Ala Arg Trp Gln Arg Lys Ile Leu Asp
3192
ACA TTA GCG ACT TAT CAT GAG CAA CAT GCG GAT GAA CCT GGC CCT GGG CCG GAA CGT CTG
Thr Leu Ala Thr Tyr His Glu Gln His Arg Asp Glu Pro Gly Pro Gly Arg Glu Arg Leu
3252
CGA CGT ATG GCG TTG CCA ATG GAA GAT GAA GCG CTG GTA CTG TTG CTG ATT GAA AAG ATG
Arg Arg Met Ala Leu Pro Met Glu Asp Glu Ala Leu Val Leu Leu Leu Ile Glu Lys Met
3312
CGC GAA AGC GGC GAC ATC CAC AGC CAT CAC GCG TGG CTG CAT CTG CCA GAT CAC AAA GCG
Arg Glu Ser Gly Asp Ile His Ser His His Gly Trp Leu His Leu Pro Asp His Lys Ala
3372
GGC TTC AGC GAA GAG CAG CAG GCC ATC TGG CAA AAA GCA GAG CCA CTG TTT GGT GAC CAA
Gly Phe Ser Glu Glu Gln Gln Ala Ile Trp Gln Lys Ala Glu Pro Leu Phe Gly Asp Glu
3432
CCG TGG TGG GTG CGT GAC CTG GCA AAA GAG ACG GGA ACC GAC GAG CAG GCA ATG CCG CTG
Pro Trp Trp Val Arg Asp Leu Ala Lys Glu Thr Gly Thr Asp Glu Gln Ala Met Arg Leu
3492
ACT CTA GCG CAG GCG GCG CAG CAA GGA ATA ATT ACC GCG ATC GTT AAA GAT CGT TAT TAC
Thr Leu Arg Gln Ala Ala Gln Gln Gly Ile Ile Thr Ala Ile Val Lys Asp Arg Tyr Tyr
3552
CGT AAC GAT CCG ATT GTC GAG TTT GCC AAT ATG ATC GCG GAT CTC GAT CAG GAG TGT GGT
Arg Asn Asp Arg Ile Val Glu Phe Ala Asn Met Ile Arg Asp Leu Asp Gln Glu Cys Gly
3612
TCA ACC TGC GCG GCG GAT TTC GCG GAT GCG TTA GCG GTA GCG CGA AAG CTG GCA ATT CAG
Ser Thr Cys Ala Ala Asp Phe Arg Asp Arg Leu Gly Val Gly Arg Lys Leu Ala Ile Gln
3672
ATT CTG GAA TAT TTT GAC GCG ATT GCG TTT ACG CGT CGT CGT GGA AAT GAT CAT TTA TTG
Ile Leu Glu Tyr Phe Asp Arg Ile Gly Phe Thr Arg Arg Arg Gly Asn Asp His Leu Leu
3732
CGC GAC GCA TTA TTA TTT CCG GAA AAA TAA GGAATGATTAAATTAAGTTTAAAAATAAAATTAATACAAA
Arg Asp Ala Leu Leu Phe Pro Glu Lys ###
3801
ATTCTTATGAATTTAAAAAGCACATTGTTTAATGAATACAATGTGCTTTTTATTAGATTAATTTTGATAATCAATAAT
3881
ACTGATCATATTTTCGAATGAAATCCTCAGTAAGCTGCCGCCCTTTTTTACACTTTCAGGAGTGTGTTATGGCAGCTT
3961
CAACGTTCTTTATTCTCTGTGAATGTCATCGGCCTGATTCATTGACTGATGCAATGAATATGATGGCAGATTATGGA
4041
TTTACCCGTACC

Abbildung 11:

Nukleotidsequenz von sela und selB und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Genprodukte.

Dargestellt ist die Sequenz des RNA-gleichen DNA-Stranges. Die Aminosäuresequenz des sela Genprodukts ist oberhalb der Nukleotidsequenz, die des selB Genprodukts unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Die Ribosomenbindestellen sind unterstrichen. Das ATG Startcodon und das TGA Stoppcodon eines potentiellen offenen Leserahmens in 5' Richtung vor dem sela Gen sind eingerahmt. Palindrome Sequenzen in 3' Richtung zum selB Gen sind durch horizontale Pfeile gekennzeichnet.

Um einen Hinweis auf die Funktion der selA und selB Genprodukte zu erhalten, wurden die Aminosäuresequenzen mit denen von Proteinen der NBRF- und MIPSX-Datenbank des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried) verglichen. Für das selA Genprodukt konnte keine signifikante Sequenz-ähnlichkeit mit den verglichenen Proteinsequenzen erhalten werden. Dagegen zeigte das selB Genprodukt im aminoterminalen Teil eine signifikante Homologie zur Aminosäuresequenz des Elongationsfaktors Tu aus E. coli (siehe "Diskussion").

Stromaufwärts von selA befindet sich ein weiterer offener Leserahmen, der an Position 123-125 mit einem ATG Codon beginnt und an Position 429-431 mit einem TGA Codon endet. Er könnte für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 11.4 kDa kodieren. 4 bp vor dem ATG Codon befindet sich eine mögliche Ribosomenbindestelle der Sequenz TGG. Die chromosomale Deletion von WL31153 (Δ selAB) betrifft auch diesen DNA Bereich (siehe unten). Da WL31153 jedoch allein durch das Plasmidpaar pWL171 (selA') und pWL101 (selB') komplementiert wird und da pWL171 diesen putativen offenen Leserahmen nicht trägt, kann eine direkte Beteiligung dieses offenen Leserahmens am Selenierungsprozeß ausgeschlossen werden.

7. Rückhybridisierung der klonierten DNA-Fragmente

Um die genomische Organisation der Gene selA und selB im Wildtyp MC4100 und in den Mutanten WL153 und WL30153 zu vergleichen, wurden DNA-Hybridisierungsexperimente durchgeführt.

Im ersten Experiment wurden chromosomale DNA aus MC4100 und DNA des Cosmids pWL1 mit MluI gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 0.6 % Agarosegel aufgetrennt und dann auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Als Sonde für die Hybridisierung diente 32 P-markierte Plasmid-DNA von pWL101.

Wie Abb. 12 B zeigt, wiesen die hybridisierenden MluI Fragmente der Cosmid-DNA (Spur 1) und der chromosomalen DNA (Spur 2) die gleiche Größe auf. Das Hybridisierungsmuster der MluI Fragmente steht in Übereinstimmung mit der Restriktionskarte von pWL107, da Fragmente von 0.9 kb und 2.3 kb hybridisierten. Das zusätzlich auftretende Signal bei 3.1 kb zeigt die relative Lage der nächsten MluI-Spaltstelle in 3' Richtung zu selB. Die zusätzlich in Spur 1 hybridisierenden Fragmente resultieren von partiell geschnittener Cosmid-DNA.

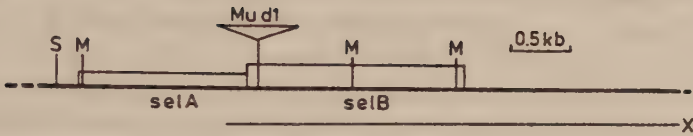
Für ein anderes Hybridisierungsexperiment mit chromosomaler DNA aus MC4100 (gespalten mit MluI) wurde das 2.3 kb MluI Fragment aus pWL107 als Sonde verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente das nicht markierte 2.3 kb MluI Fragment aus pWL107. In chromosomaler DNA hybridisierte ebenfalls ein 2.3 kb MluI Fragment (Ergebnis nicht gezeigt).

Die Ergebnisse dieser Experimente beweisen, daß während der Klonierung von selA und selB keine Umlagerungen in der DNA stattgefunden haben.

In einem weiteren Hybridisierungsexperiment wurde versucht, in der Mutante WL153 die Insertionsstelle des Mu d1 Phagen in selB zu kartieren. Zusätzlich wurde versucht, das Ausmaß der chromosomalen Deletion in WL30153 (Δ selAB) zu bestimmen, die in Zusammenhang mit der Exzision des Mu d1 Phagen in WL153 entstanden war.

Dazu wurden chromosomale DNA aus MC4100, WL153 und WL30153 mit MluI und Sall gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 0.6 % Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Als Sonde für die Hybridisierung diente 32 P-markierte Plasmid-DNA von pWL101 (siehe Abb. 12 B).

A



B

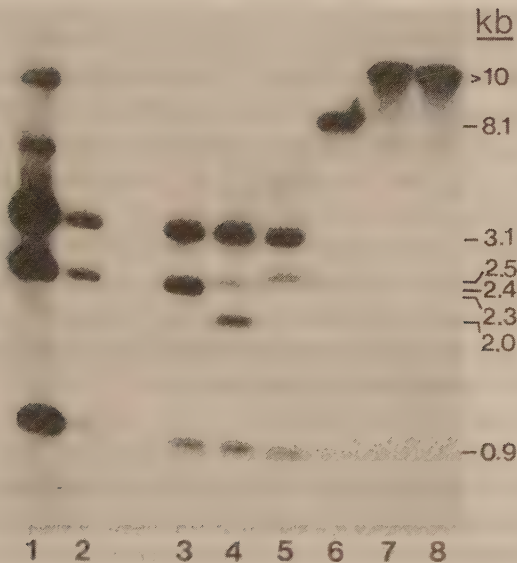


Abbildung 12:

Hybridisierungsanalyse der chromosomalen selAB Region in MC4100 (sel⁺), WL153 (selB::Mu d1) und WL30153 (Δ selAB).

- (A) Vereinfachte Restriktionskarte von selB::Mu d1 und verwendete Hybridisierungssonde (X).
- (B) Autoradiogramm einer Hybridisierung mit der in (A) angegebenen Hybridisierungssonde (X). DNA des Cosmids pWL1 gespalten mit MluI (Spur 1); chromosomale DNA aus MC4100 (Spuren 2, 3, 6), WL153 (Spuren 4, 7) und WL30153 (Spuren 5, 8), gespalten mit MluI (2, 3, 4, 5) SalI (6, 7, 8).

Wie in DNA aus MC4100 (Spur 3) hybridisierten in DNA aus WL153 (Spur 4) MluI Fragmente von 0.9 kb und 3.1 kb. Anstelle eines 2.3 kb MluI Fragments in DNA aus MC4100, hybridisierten in DNA aus WL153 zwei MluI Fragmente einer Größe von 2.0 kb und 2.4 kb. Mit Hilfe der Restriktionskarte von Mu d1 (89) und der (aus anderen Daten) bekannten Orientierung von Mu d1 in selB (Ergebnisse nicht gezeigt) kann daraus abgeleitet werden, daß sich die Insertionsstelle circa 100 bp stromabwärts vom ATG Codon in selB befindet (Abb. 12 A).

Auch in DNA aus WL30153 (Spur 5) ergaben sich Hybridisierungssignale für MluI Fragmente von 0.9 kb und 3.1 kb. Dies bedeutet, daß in WL30153 durch die Exzision von Mu d1 nicht das gesamte selB Gen deletiert ist. Anstelle eines 2.3 kb MluI Fragments, wie in DNA aus MC4100, hybridisierte ein 2.5 kb MluI Fragment der chromosomalen DNA aus WL30153. Da die chromosomale Deletion von WL30153 die selB internen MluI-Schnittstellen nicht betrifft (Signal bei 0.9 kb) kann daraus abgeleitet werden, daß die Deletion über die sela interne MluI-Stelle hinausreicht.

Das unterschiedliche Hybridisierungsmuster von mit SalI gespaltener DNA aus MC4100 und WL30153 zeigt darüberhinaus, daß im Chromosom von WL30153 auch die stromaufwärts vor sela gelegene SalI-Spaltstelle deletiert ist.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in WL30153 das gesamte sela Gen und der proximale Teil des selB Gens deletiert sind.

8. Expression des selA und selB Gens mit Hilfe des T7 RNA Polymerase/Promotor Systems

Mit Hilfe des T7 RNA Polymerase/Promotor Systems wurde untersucht, ob die durch Sequenzanalyse bestimmten offenen Leserahmen von selA und selB für Proteine mit entsprechendem Molekulargewicht kodieren.

Das Expressionssystem besteht aus zwei kompatiblen Plasmiden. Das Plasmid pGP1-2 kodiert für einen temperatursensitiven λ -Repressor und für T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle eines λ -Promotors. Das Plasmid pT7-6 trägt den T7 Promotor $\phi 10$ und in 3' Richtung benachbart einen Polylinker, der das Einligieren gewünschter Gene ermöglicht (120).

Die für die Expressionsversuche verwendeten Plasmide sind in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt.

Die Konstruktion des rekombinanten pT7 Plasmids pWL184 (selA*B*) erfolgte über eine 3-Komponentenligation (Abb. 13). Dazu wurde aus pWL107 ein 2.2 kb SalI/SphI Fragment mit dem selA Gen und dem proximalen Teil des selB Gens isoliert. Aus dem Plasmid pWL144 wurde ein 1.3 kb SphI/SalI Fragment mit dem distalen Teil des selB Gens isoliert. Beide DNA-Fragmente wurden dann in pT7-6 (gespalten mit SalI) ligiert. Das erhaltene Plasmid konnte wie erwartet die Mutante WL31153 (Δ selAB) komplementieren.

Zur Konstruktion von pWL187 (Abb. 14) wurde Plasmid-DNA von pWL107 mit ClaI gespalten. Die 5' überstehenden Enden wurden mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt (ClaI*). Nach Spaltung mit SalI wurde ein 1.7 kb SalI/ClaI* Fragment mit dem selA Gen isoliert. Parallel wurde DNA des Plasmids pT7-6 mit BamHI gespalten, und die 5' überstehenden Enden wurden mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)

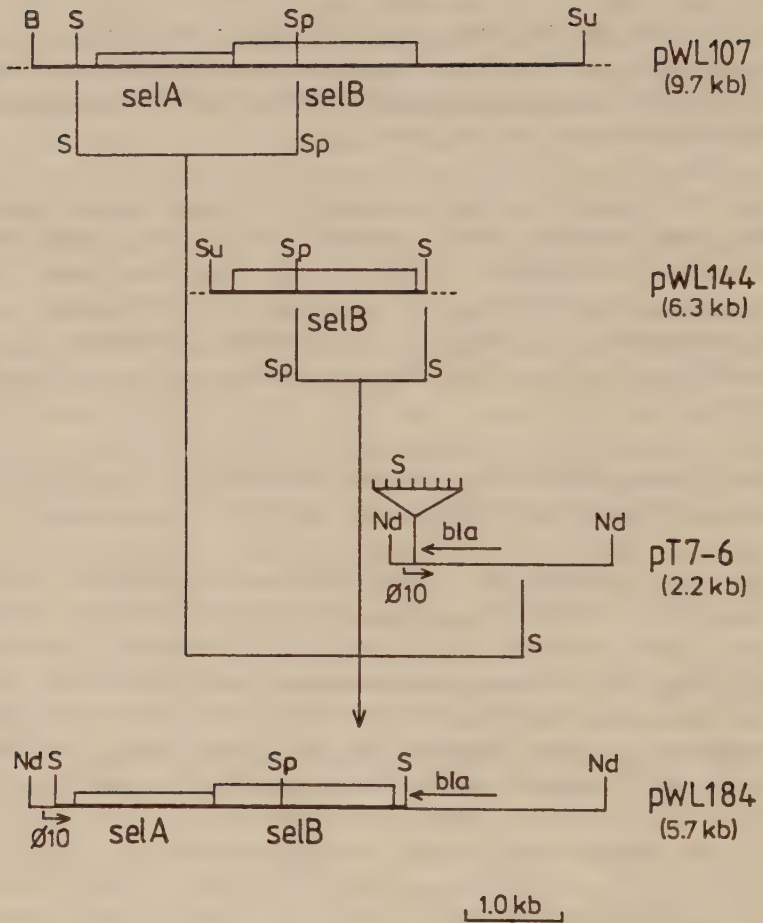


Abbildung 13:

Konstruktion des Plasmids pWL184.

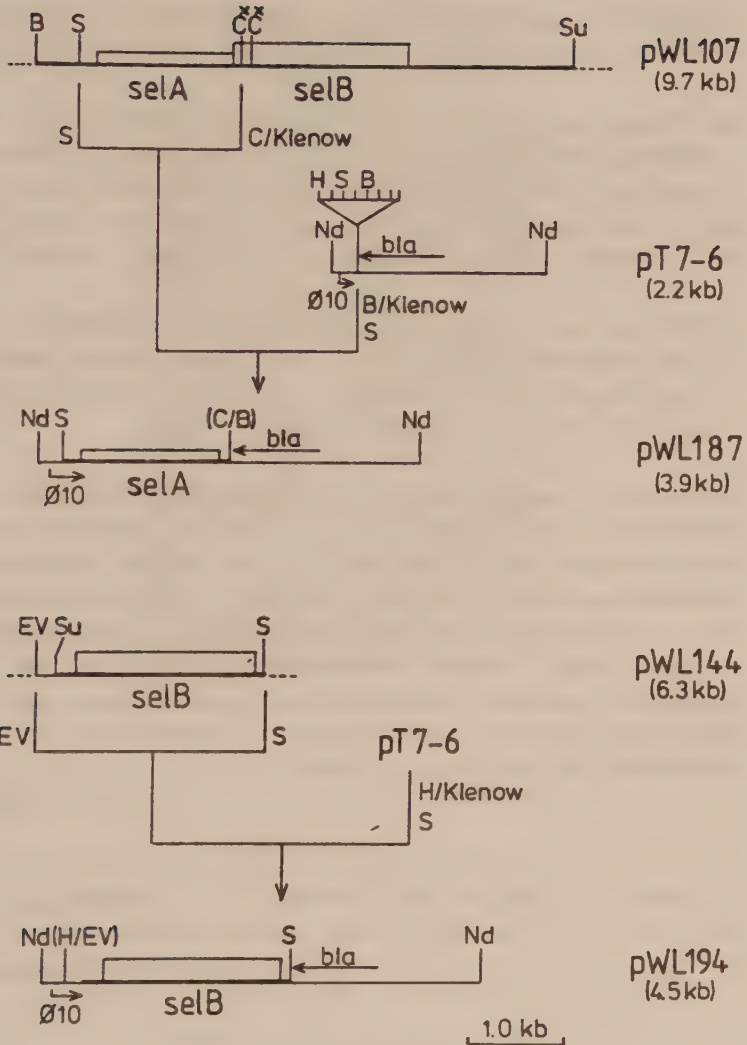


Abbildung 14:

Konstruktion der Plasmide pWL187 und pWL194.

aufgefüllt. Nach Spaltung mit SallI wurde das Vektorfragment mit dem 1.7 kb SallI/ClaI* Fragment aus pWL107 ligiert.

Zur Konstruktion von pWL194 wurde aus pWL144 ein 2.3 kb EcoRV/SallI Fragment mit dem selB Gen isoliert. DNA von pT7-6 wurde mit HindIII gespalten, die 5' überstehenden Enden wurden aufgefüllt, und nach Spaltung mit SallI wurde das Vektorfragment mit dem EcoRV/SallI Fragment ligiert.

Die rekombinanten Plasmide pWL184, WL187 und pWL194 wurden in den Stamm K38, der bereits das Plasmid pGP1-2 enthielt, transformiert. Das Ergebnis der Markierungsexperimente dieser Kulturen ist in Abbildung 15 zu sehen.

K38/pWL187 (selA*) synthetisierte ein Protein mit 52 kDa, K38/pWL194 (selB*) ein Protein mit 66 kDa. Die erhaltenen Werte stimmen gut mit den von der DNA-Sequenz abgeleiteten Molekulargewichten von 50.6 kDa für das SelA Protein und 68.8 kDa für das selB Genprodukt überein. Von K38/pWL184 (selA*, selB*) wurde sowohl das selA als auch das selB Genprodukt gebildet. Überraschend war dabei, daß die Bande des SelA Proteins (52 kDa) schwächer ausgeprägt war als die Bande des SelB Proteins (66 kDa).

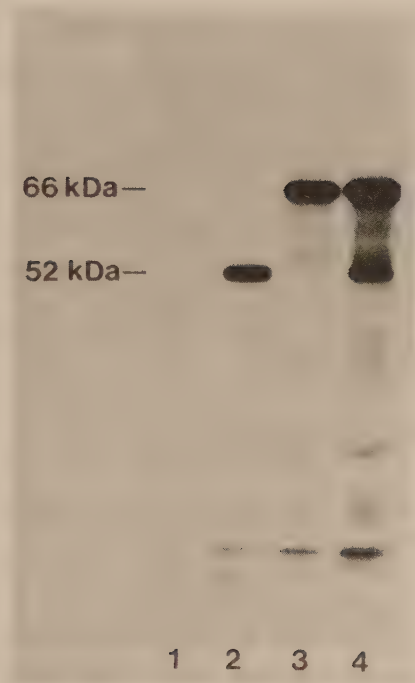


Abbildung 15:

Autoradiogramm ^{35}S -Methionin markierter und elektrophoretisch aufgetrennter Zellextrakte von K38/pGP1-2, transformiert mit verschiedenen pT7-Plasmiden, nach Induktion des T7 Expressionssystems.

- Spur 1: pT7-6
- Spur 2: pWL187 (selA⁺)
- Spur 3: pWL194 (selB⁺)
- Spur 4: pWL184 (selA⁺ B⁺)

III. Klonierung und Analyse des selC Gens

Durch lokalisierte Mutagenese des "in-frame" TGA (Stopp) Codons in fdhF war gezeigt worden, daß dieses Triplet den cotranslationalen Einbau von Selenocystein in das 80 kDa Selenopolypeptid determiniert (132). Dies deutet darauf hin, daß es in *E. coli* eine tRNA Spezies gibt, die das UGA Codon der fdhF mRNA erkennt und den Einbau von Selenocystein in die Proteinkette vermittelt. In der vorliegenden Arbeit konnte das Gen (selC) für diese besondere tRNA in der Tat identifiziert werden.

1. Klonierung von selC

Für die Klonierung von selC wurde ein ΔrecA Derivat von MBO7 (selC*) konstruiert. Der erhaltene Stamm MN1 (selC* ΔrecA::Tn10) wurde dann mit der bereits beschriebenen Cosmidgenbibliothek infiziert. Unter etwa 1 000 cosmidhaltigen Klonen zeigten zwei Kolonien nach anaerober Bebrütung auf MacConkey-Nitrat-Platten einen FDH_H-positiven Phänotyp. Aus diesen beiden Klonen wurde die Cosmid-DNA isoliert und in MN1 retransformiert. Alle erhaltenen Transformanten zeigten FDH_H- und FDH_S-positiven Phänotyp. Ein Cosmid wurde ausgewählt und mit pMN10 bezeichnet.

Zur Subklonierung des selC Gens wurde DNA des Cosmids pMN10 mit dem Enzym Sau3A partiell gespalten, und die erhaltenen Fragmente wurden in pACYC184 (linearisiert mit BamHI) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* MN1 transformiert. Nach 24-stündiger Inkubation unter N₂-Atmosphäre und anschließender Übersichtung mit BV Agar zeigten zehn Klone Reduktion von Benzylviologen. Aus ihnen wurde Plasmid-DNA isoliert und auf die Größe des jeweiligen Inserts hin untersucht. Das Plasmid pMN60 mit dem kleinsten Insert wurde ausgewählt; es enthält ein 850 bp Sau3A Fragment chromosomaler DNA aus MC4100 (Abb. 16). Die Retransformation von pMN60 in MN1 ergab ausschließlich

Transformanten mit FDH-positivem Phänotyp.

2. Subklonierung von selC

Im Bereich des 850 bp Sau3A Inserts von pMN60 wurde keine Restriktions-Schnittstelle gefunden, die sich für eine gezielte Subklonierung geeignet hätte. Es ergab sich jedoch die Möglichkeit, von der AvaI Schnittstelle aus nach der Methode von Maxam und Gilbert (79) die Nukleotidsequenz des Inserts in beide Richtungen zu bestimmen. Die Translation der erhaltenen DNA-Sequenzen in jeweils drei Leserastern ergab keinen Hinweis auf einen offenen, für ein Protein kodierenden Leserahmen, überraschenderweise jedoch einen Bereich, der für eine tRNA kodieren kann.

Als nächstes wurde daher untersucht, ob derjenige DNA-Bereich des Inserts von pMN60, der ausschließlich für diese tRNA kodiert, für die Komplementation des Defekts der Mutante MN1 (selC^{*}) ausreicht. Abbildung 16 zeigt ein Schema der Subklonierung.

Dazu wurde DNA des Plasmids pMN60 mit NheI und SspI gespalten, und das resultierende 379 bp Fragment wurde isoliert. Durch Behandlung mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurden anschließend die 5' überstehenden Enden an der NheI-Stelle aufgefüllt. Das 379 bp Fragment enthält 233 bp chromosomaler DNA und 146 bp des Tetracyclinresistenzgens (cat) von pACYC184. Dieses Fragment wurde in zwei parallelen Ansätzen in pUC18 (gespalten mit SmaI) und in pACYC184 (2.7 kb EcoRV/HincII Fragment) einligiert. Die erhaltenen Plasmide, bezeichnet mit pMN81 und pMN73, konnten den Defekt der Mutante MN1 komplementieren. Daraus kann abgeleitet werden, daß sie ein intaktes selC Gen tragen.

Anschließend wurde geprüft, ob MN1 (selC^{*}) in Anwesenheit des Plasmids pMN73 (selC⁺) wieder Selen in die Polypeptide

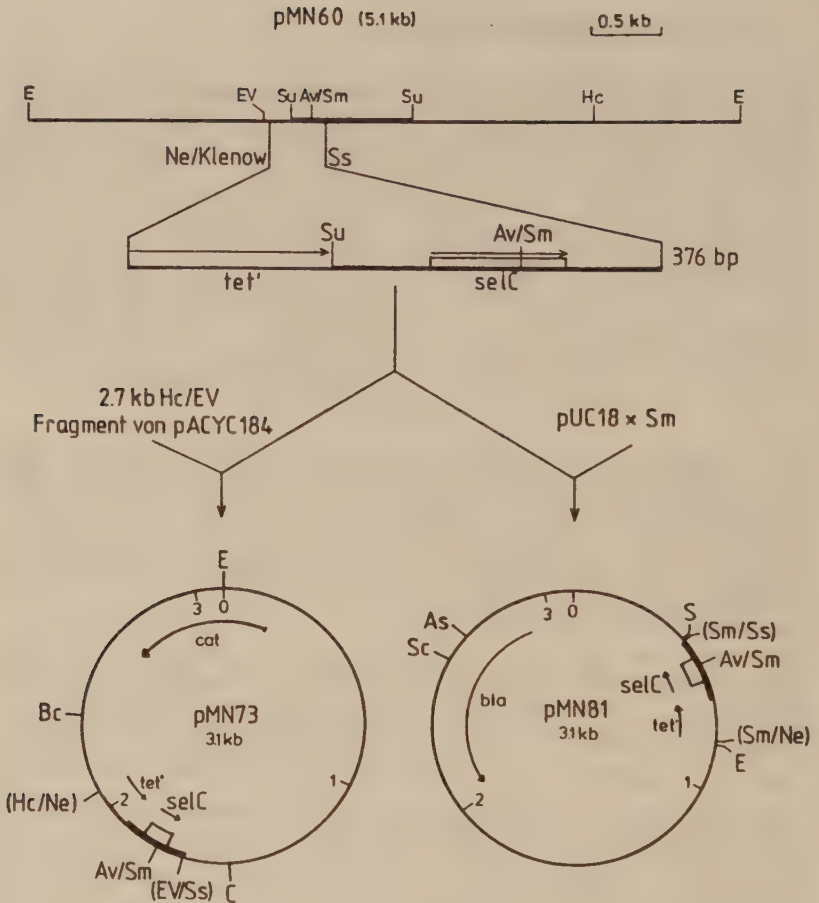


Abbildung 16:

Restriktionskarten der Plasmide pMN60, pMN73 und pMN81 und Schema zur Subklonierung von *selC*.

der FDH₁ und FDH₂ inkorporieren kann. Dazu wurden Zellen von MN1/pMN73 und MN1/pACYC184 unter anaeroben Bedingungen (mit bzw. ohne Nitrat) angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Als Referenz diente EMG29, der Elternstamm von MN1. Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, zeigte MN1/pMN73 wieder Selenierung der 80 kDa und 110 kDa Polypeptide. Im Extrakt von MN1/pACYC184 war erwartungsgemäß kein markiertes Selenopolypeptid nachweisbar.

3. Inaktivierung von selC

Zur Bestätigung der bisher erhaltenen Daten zur Eingrenzung des selC Gens wurde eine Mutagenese des selC Gens durchgeführt. Dazu wurden Insertionen an der SmaI (AvaI) Schnittstelle des Gens eingeführt. Ausgehend von pMN73 (selC⁺) wurden zwei Plasmide mit verschieden großen Insertionen erhalten (Abb. 18).

Im ersten Ansatz wurde DNA des Plasmids pMN73 mit Nuklease AvaI gespalten, die 5' überstehenden Enden wurden mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt und religiert. Das erhaltene Plasmid (pMN111) weist an der zerstörten AvaI Stelle eine 4 bp große Insertion der Sequenz GGCC auf.

Im zweiten Ansatz wurde DNA des Plasmids pMN73 mit dem Enzym SmaI gespalten und mit dem 2.0 kb Omega-Element aus pHP45Q (95) ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMN120 bezeichnet. Das Omega-Element kodiert für Resistenz gegen Spektinomycin und Streptomycin und weist an beiden Enden Terminationssignale für die Transkription und Translation auf.

Die Plasmide pMN111 und pMN120 wurden in MN1 auf Komplementation getestet. Es zeigte sich, daß keines der beiden Plasmide den Defekt der Mutante MN1 (selC⁺) komplementieren konnte.

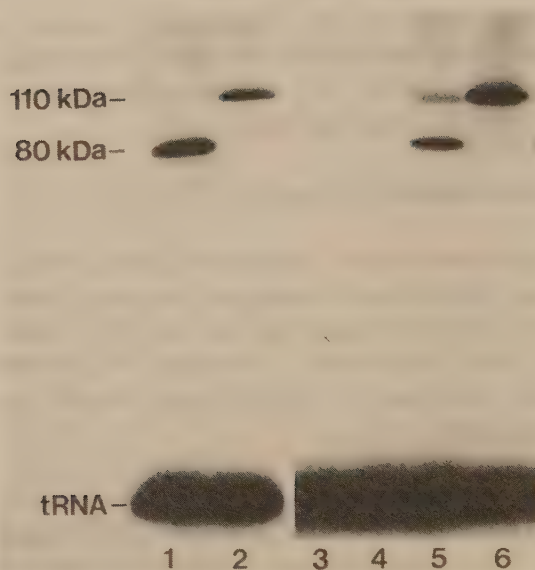


Abbildung 17:

Autoradiogramm von elektrophoretisch aufgetrennten SDS-Extrakten ^{75}Se -Selenit markierter Zellen nach anaerober Anzucht in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Nitrat.

- Spur 1: EMG29 ohne Nitrat
- Spur 2: EMG29 mit Nitrat
- Spur 3: MN1/pACYC184 ohne Nitrat
- Spur 4: MN1/pACYC184 mit Nitrat
- Spur 5: MN1/pMN73 ohne Nitrat
- Spur 6: MN1/pMN73 mit Nitrat

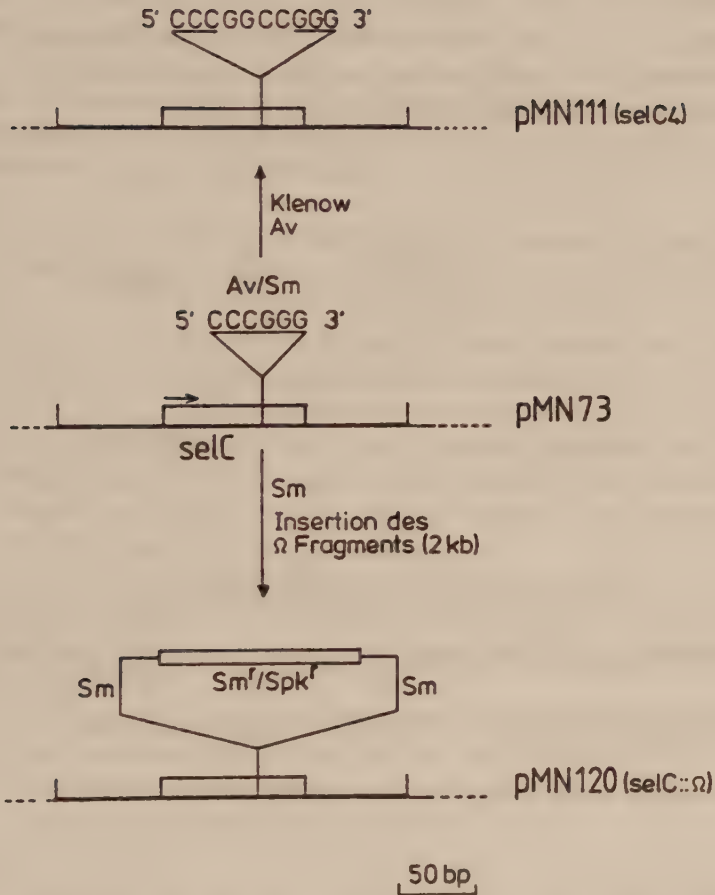


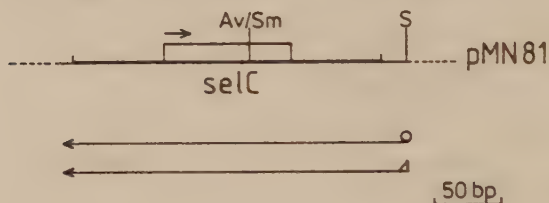
Abbildung 18:

Konstruktion der Plasmide pMN111 und pMN120 mit Insertionen
im *selC* Gen

4. Sequenzierung von selC und Analyse der Sequenzdaten

Ausgehend von der flankierenden Sall Schnittstelle im Vektoranteil von pMN81 wurden nun beide Stränge des 233 bp großen Inserts durchgehend sequenziert (Abb. 19).

A



B

```

      -35                               -10
GATCTGGGGGATGTAGAACTCAAGGAAGTAGCTATAATGCGCCCCGCTCCATGTAGCA
ATCGAGGGCGCGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAATCCAGTTGGGG
CCGCCAGCGGTCCCCGGGCAGGTTCGACTCCTGTGATCTTCCGCCA↓AAATGCCTCTCCTGA
CGTTCTCCAACCCCTTGTAACTGTCAATCCAGATATTTTCTACTGCTCAAT
  
```

Abbildung 19:

Strategie der Sequenzierung (A) und Nukleotidsequenz (B) des selC Gens.

- (A) 5' -Markierung bzw. 3' -Markierung des DNA-Fragments sind mit Dreieck bzw. Kreis gekennzeichnet.
- (B) Dargestellt ist die Sequenz des RNA-gleichen Stranges von 5' nach 3'. Das selC Strukturgen ist eingerahmt. Mögliche Transkriptionssignale (-10 und -35 Region) sind unterstrichen. Die SmaI (AvaI) Schnittstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ergab, daß dem selC Gen eine für *E. coli* typische Promotorregion (98) vorgeschaltet (Region "-10" und Region "-35") ist.

Die Primärstruktur und die daraus abgeleitete Sekundärstruktur der selC tRNA (Abb. 20) zeigen eine Reihe von strukturellen Besonderheiten:

1. Die tRNA weist ein Anticodon der Sequenz UCA auf, das komplementär zum UGA Codon in der fdhF mRNA (133) ist.
2. Der Aminoacyl-Akzeptor-Stamm der tRNA besteht aus acht, statt wie üblich aus sieben Nukleotidpaaren.
3. Die tRNA weist einen sehr langen Extraarm mit 22 Nukleotiden auf. Die Gesamtlänge dieser tRNA beträgt 95 Basen, und sie ist damit größer als alle bisher bekannten tRNA-Moleküle aus *E. coli*.
4. An insgesamt fünf Positionen weicht die Nukleotidsequenz dieser tRNA vom Konsensus aller anderen tRNA-Spezies (110, 111) ab.

- Das selC Genprodukt besitzt an Position "9" ein G, die Konsensussequenz weist als erste Base nach dem Akzeptor-Stamm jedoch stets ein U auf.
- Charakteristisch für diese tRNA ist auch das Purin-Pyrimidin-Basenpaar zwischen den Basen an Positionen "12" und "25". Außer der Methionin-Initiator-tRNA zeigen alle anderen tRNA's an diesen Positionen ein Pyrimidin-Purin-Basenpaar.
- An den Positionen "15" und "16" besitzt das selC Genprodukt zwei Pyrimidinnukleotide anstelle der normalerweise vorhandenen Purinnukleotide.



Abbildung 20:

Sekundärstruktur der tRNA^{Val} aus E. coli.

Durch Kreise sind die Nukleotide gekennzeichnet, die mit der Konsensussequenz der tRNA-Gene aus E.coli übereinstimmen. Von der Konsensussequenz abweichende Nukleotide sind mit Quadraten umgeben. Die Punktmutation im selc* Gen aus MB07 ist durch einen Pfeil angezeigt.

IV. Klonierung und Sequenzierung des mutierten selC Gens (selC*) aus MB07

Die Klonierung und Sequenzierung des selC* Gens aus MB07 wurde durchgeführt, um die Mutation zu identifizieren, die zur Bildung einer inaktiven tRNA führt und den Ausfall der Selenierung zur Folge hat.

1. Rückhybridisierung des klonierten selC* Gens mit chromosomaler DNA aus MB07 (selC*)

Über DNA-DNA Hybridisierungsexperimente mit dem klonierten selC* Gen als Sonde wurde zunächst ein geeignetes Restriktionsfragment chromosomaler DNA aus MB07 identifiziert, auf dem sich das mutierte selC* Gen befindet. Parallel dazu wurde auch chromosomale DNA aus MC4100 (selC*) zur Hybridisierung eingesetzt.

10 µg chromosomale DNA aus MC4100 und MB07 wurden dazu jeweils mit SmaI, mit EcoRI und SmaI bzw. mit EcoRI und SalI gespalten. Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden in einem 0.6 % Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Als ³²P-markierte Sonde diente das 400 bp große EcoRI/SalI Fragment mit dem selC* Gen aus PMN81. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis.

Die hybridisierenden Fragmente chromosomaler DNA aus MC4100 und MB07 wiesen in allen Fällen jeweils die gleiche Größe auf. In mit SmaI gespaltenen DNA hybridisierten Fragmente einer Größe von 2.5 kb und >10 kb. Mit SmaI und EcoRI gesplattene DNA ergab Hybridisierungssignale bei 0.9 kb und >10 kb. In mit EcoRI und SalI gesplattener DNA hybridisierte ein einzelnes, 2.3 kb großes DNA-Fragment. Diese Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

- Das selC Gen befindet sich auf einem 2.3 kb großen EcoRI/SalI Fragment.

- Aufgrund des Hybridisierungsmusters in mit SmaI und EcoRI gespaltener DNA kann die relative Lage des selC Gens in dem 2.3 kb EcoRI/SalI Fragment angegeben werden (Abb. 22).
- Nachdem in mit SmaI gespaltener DNA nur zwei Fragmente und in EcoRI/SalI gespaltener DNA nur ein einzelnes Fragment hybridisiert, gibt es nur eine einzige Kopie von selC im Chromosom von E. coli.

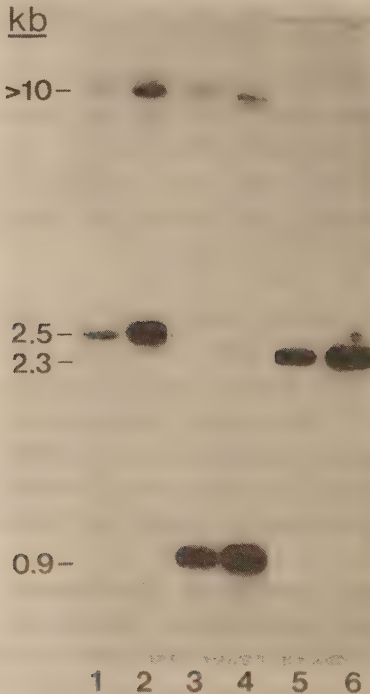


Abbildung 21:

Autoradiogramm einer Rückhybridisierung des klonierten selC* Gens mit chromosomaler DNA aus MC4100 (selC*) und aus MB07 (selC*). DNA aus MC4100 (Spuren 1, 3, 5) und MB07 (Spuren 2, 4, 6), gespalten mit SmaI (1, 2), EcoRI und SmaI (3, 4), EcoRI und SalI (5, 6).

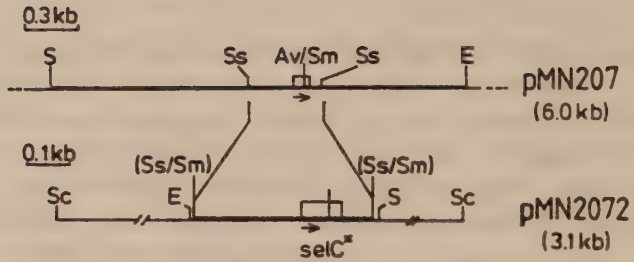
2. Klonierung und Sequenzierung des selC* Gens

Chromosomale DNA aus MB07 wurde mit den Enzymen EcoRI und SalI gespalten. Fragmente einer Größe von etwa 2.3 kb wurden isoliert und in pBR322 (gespalten mit EcoRI und SalI) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in DH1 transformiert. Die Identifizierung des gewünschten Klons erfolgte über DNA-DNA-Hybridisierung. Um dabei eine Hybridisierung der selC* Sonde (400 bp Fragment aus pMN81) mit dem chromosomalen selC Gen von DH1 auszuschließen, wurde aus 48 Transformanten die Plasmid-DNA isoliert. Die Plasmide wurden mit EcoRI und SalI geschnitten, die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Übertragung auf Nitrocellulosefilter in die Hybridisierung eingesetzt. Ein Plasmid (pMN207) enthielt das gewünschte 2.3 kb EcoRI/SalI Fragment (Abb. 22).

Um das selC* Gen durchgehend doppelsträngig sequenzieren zu können, wurde ein geeignetes kleines Fragment in pUC18 subkloniert. Restriktionsanalysen und Hybridisierungsexperimente ergaben, daß sich das selC* Gen vollständig auf einem 400 bp SspI Fragment befindet. Dieses Fragment wurde in pUC18 (linearisiert mit SmaI) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMN2072 bezeichnet. Das mutierte selC* Gen (aus MB07) weist in pMN2072 die gleiche Orientierung auf wie das Wildtyp selC Gen in pMN81. Deshalb wurde wiederum ausgehend von der SalI Stelle des Plasmidvektors nach der Methode von Maxam und Gilbert (79) die Nukleotidsequenz des Inserts auf beiden Strängen bestimmt.

Die Nukleotidsequenz des Wildtyp- und Mutantenallels des selC Strukturgens und der in 5' und 3' Richtung angrenzenden, nicht kodierenden DNA-Bereiche wurden miteinander verglichen. Dabei wurde nur ein einziger Basenaustausch gefunden. Er befindet sich in dem für tRNA Gene universell konservierten Sequenzmotiv GTTC. Der Guanosinrest an Position 71 (selC*) ist gegen einen Adenosinrest (selC*) ausgetauscht (Abb. 20 und Abb. 22).

A



B

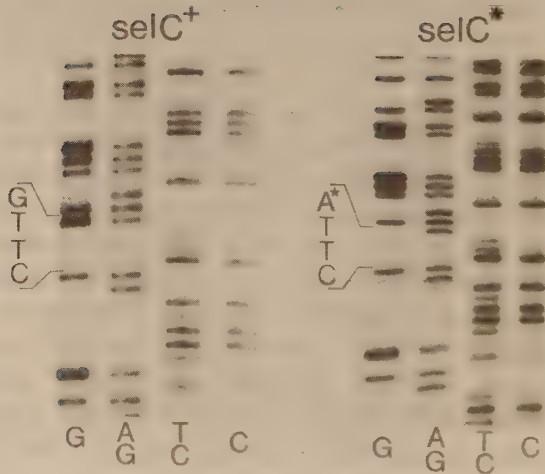


Abbildung 22:

Klonierung und Sequenzanalyse des selC Gens aus MB07.

A) Schematische Restriktionskarten der Plasmide pMN207 (Vektor: pBR322) und pMN2072 (Vektor: pUC18).

B) Autoradiogramm von Sequenzgelen

Gezeigt sind Ausschnitte der Sequenzleiter von Wildtyp und Mutantenallel von selC. Der Stern bezeichnet den einzigen Basenaustausch im selC* Gen aus MB07.

V. Klonierung und Analyse des seld Gens

Die Mutante MB08 (seld) kann Selen weder in Proteine noch in tRNA einbauen. Das Genprodukt von seld könnte demnach entweder an der zellulären Aufnahme oder der Reduktion von Selenit beteiligt sein oder als Selen-Donor-Molekül für Selenierungsreaktionen generell fungieren. Für eine nähere Analyse seiner Funktion wurde das seld Gen kloniert.

1. Klonierung von seld

Dazu wurde zuerst ein Δ recA Derivat der Mutante MB08 (seld) konstruiert. Der erhaltene Stamm MN30 (seld Δ recA::Tn10) wurde mit der Cosmidgenbibliothek infiziert und auf Komplementation untersucht. Einer unter etwa 700 cosmidhaltigen Klonen zeigte nach anaerober Bebrütung auf MacConkey-Nitrat-Platten einen FDH_w-positiven Phänotyp. Dieser Klon konnte auch Gas aus Glucose bilden.

Aus diesem Klon wurde die Cosmid-DNA (pMN30) isoliert und zur Subklonierung mit Sau3A partiell gespalten. Die Fragmente wurden in pACYC184 (linearisiert mit BamHI) kloniert, und der Ligationsansatz wurde in MN30 (seld) transformiert. Nach anaerober Bebrütung zeigten drei von ungefähr 1 000 Transformanten eine Reduktion von Benzylviologen. Die Retransformation der isolierten Plasmide aus diesen Klonen in MN30 ergab ausschließlich Transformanten mit FDH-positivem Phänotyp.

Ein Plasmid, bezeichnet mit pMN302, wurde ausgewählt und für die weiteren Experimente verwendet. Es trägt ein 3.8 kb Sau3A Fragment chromosomaler DNA aus MC4100 (Abb. 23).

Um möglichst einfach auf dem 3.8 kb Fragment von pMN302 den DNA-Bereich zu identifizieren, in dem sich das seld Gen befindet, wurde eine Insertionsmutagenese durchgeführt. Dazu wurde DNA von pMN302 mit MluI gespalten. Die 5'

überstehenden Enden wurden mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt und religiert. Wie sich zeigte, konnte das erhaltene Plasmid pMN310 den Defekt der Mutante MN30 (selD) nicht mehr komplementieren.

Von B. Veprek in unserem Labor wurde ein 1.2 kb BstEII Fragment aus pMN302 in pBR322 subkloniert; das entsprechende Plasmid pMN330 konnte den Defekt der Mutante MN30 komplementieren (B. Veprek, persönl. Mitteilung). Das Plasmid pMN330 wurde von ihr zur Verfügung gestellt.

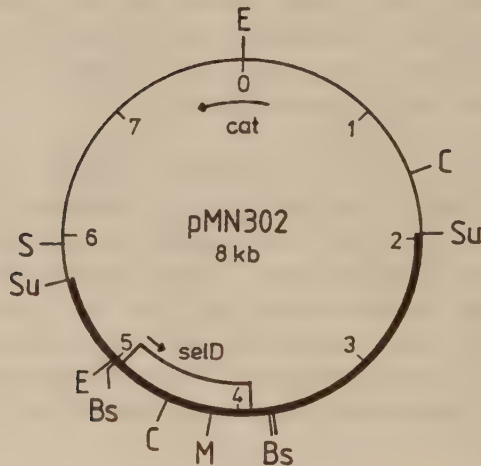


Abbildung 23:

Restriktionskarte des Plasmids pMN302.

2. Sequenzierung von selD

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz von selD erfolgte nach der Methode von Maxam und Gilbert (79). Insgesamt wurden auf einer Länge von ungefähr 1 600 bp beide Stränge sequenziert. Die Sequenzierstrategie ist in Abbildung 24, die ermittelte Sequenz in Abbildung 25 dargestellt.

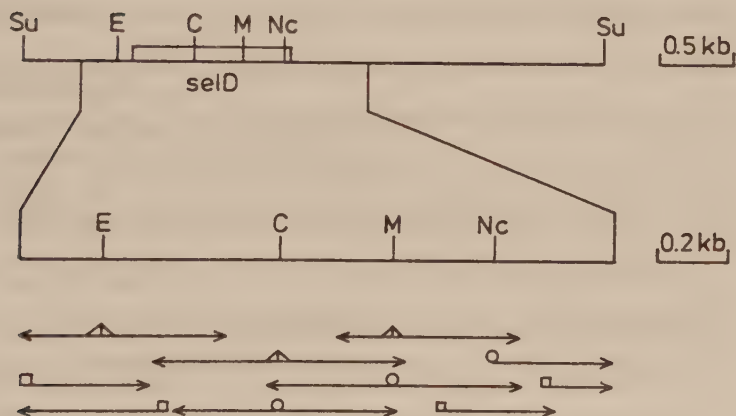


Abbildung 24:

Strategie zur Sequenzierung des selD Gens.

Im oberen Teil ist das 3.8 kb Sau3A Insert des Plasmids pMN302 dargestellt, der untere Teil zeigt den sequenzierten Bereich. 5'-Markierungen werden durch Dreiecke, 3'-Markierungen durch offene Kreise angezeigt. Ein Quadrat bedeutet Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode.

Die Sequenz des seld Gens ergab einen singulären offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 347 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 36.6 kDa kodieren kann. Als mögliche Ribosomenbindestelle (116) befindet sich 5' zum ATG Codon in einem Abstand von sechs Basenpaaren die Sequenz GGAG. Im 5' flankierenden DNA Bereich von seld konnten jedoch keine für E. coli typische Promotormotive (98) identifiziert werden.

1
GGCGTTTGGCGGCATCTGCGCCAGTCGCGCATTAACTGAAAGTCCGGTACTGCGTGAAGCATTCCGTTGCCGTGAGCAGG

81
ATAAAATTCTCGGTTTTCTCTACCTCGGTACGCCGAGCTCAAAGCATCTACGTGATTAACTCCCGACCCGACGCCG

161
TTTGTAAGTTATTCTGATAATTGTGCGGAACTGCTGCGATTGTGAGCAAAGCGCAGGAATTCAGACACTCTCACTTA

241
TCACCTTCACGGAATGAGGTTACCATACCCGATTGCATTGACAGGAGATGTCC Met Ser Glu Asn Ser Ile
ATG AGC GAG AAC TCG ATT

313
Arg Leu Thr Gln Tyr Ser His Gly Ala Gly Cys Gly Cys Lys Ile Ser Pro Lys Val Leu
CGT TTC ACC CAA TAC AGC CAC GGA GCT GGT TGC GGC TGT AAA ATT TCC CCA AAA GTG TTG

373
Glu Thr Ile Leu His Ser His Gly Gln Ala Lys Phe Val Asp Pro Asn Leu Leu Val Gly Asn
GAA ACC ATC CTC GAT ACT AGT GAG CAG GCG AAG TTT GTT GAT CCG AAT TTG CTT GTG GCT AAT

433
Glu Thr Arg Asp Asp Ala Ala Val Tyr Asp Leu Gly Asn Gly Thr Ser Val Ile Ser Thr
GAA ACC GCG GAC GAT GCG GCG GTG TAC GAT CTG GGC AAT GGC ACC AGC GTT ATC ACT ACC

493
Thr Asp Phe Phe Met Pro Ile Val Asp Asn Pro Phe Asp Phe Gly Arg Ile Ala Ala Thr
ACC GAC TTC TTT ATC CCG ATC GTT GAT AAT CCT TTC GAT TTT GGC GCG ATT GCG GCG ACT

553
Asn Ala Ile Ser Asp Ile Phe Ala Met Gly Gly Lys Pro Ile Met Ala Ile Ala Ile Leu
AAC GGC ATC AGC GAT ATC TTC GCG ATG GGG GGC AAA CCG ATT ATG GCG ATT GCG ATC CTC

613
Gly Trp Pro Ile Asn Lys Leu Ser Pro Glu Ile Ala Arg Glu Val Thr Glu Gly Gly Arg
GGC TGG CCG ATT AAC AAA CTT TCC CCA GAA ATT GCC GCG GAA GTG ACC GAA GGT GGA GCG

673
Tyr Ala Cys Arg Cln Gln GCG GGT Ile Ala Leu Ala Gly Gly His Ser Ile Asp Ala Pro Glu
TAT GCA TGT CGT CAG GCG GGT ATT GCG CTG GCT GGC GCT CAC TCC ATC GAT GCG CCG GAG

733
Pro Ile Phe Gly Leu Ala Val Thr Gly Ile Val Pro Thr Glu Arg Val Lys Lys Asn Ser
CCG ATT TTT GGT CTG GCG GTA ACG GGG ATC GTA CCG ACC GAG CCG GTG AAG AAA AAC AGT

793
Thr Ala Gln Ala Gly Cys Lys Leu Phe Leu Thr Lys Pro Leu Gly Ile Gly Val Leu Thr
ACC GCA CAA GCC GGA TGC AAA CTG TTC CTG ACG AAA CCG CTG GCG ATC GCG GTT CTT ACC

853
Thr Ala Glu Lys Lys Ser Leu Leu Lys Pro Glu His Gln Gly Leu Ala Thr Glu Val Met
ACG GCT GAG AAA AAA TCA CTG TTG AAA CCA GAA CAT CAG GGA CTG GCG GAT GAA GTT ATG

913
Cys Arg Met Asn Ile Ala Gly Ala Ser Phe Ala Asn Ile Glu Gly Val Lys Ala Met Thr
TGC CGG ATG AAC ATC GCA GCG GCG TCC TTT GCC AAC ATC GAA GGC GTA AAA GCG ATG ACC

973
Asp Val Thr Gly Phe Gly Leu Leu Gly His Leu Ser Glu Met Cys Gln Gly Ala Gly Val
GAC GTT ACG GGC TTT GGT CTG CTG GGC CAC TTG ACG GAA ATG TGT CAG GCG GCT GGT GTG

1033
Gln Ala Arg Val Asp Tyr Glu Ala Ile Pro Lys Leu Pro Gly Val Glu Glu Tyr Ile Lys
CAG GCA CCG GTC GAC TAT GAA GCG ATC CCG AAA CTC CCC GGT GTT GAA GAG TAC ATT AAC

1093
Leu Gly Ala Val Pro Gly Gly Thr Glu Arg Asn Phe Ala Ser Tyr Gly His Leu Met Gly
TTG GCG GCA GTA CCT GGC GGC ACT GAA CGT AAC TTT GCC AGC TAC GGT CAT CTG ATG GGT

1153
Glu Met Pro Arg Glu Val Arg Asp Leu Leu Cys Asp Pro Gln Thr Ser Gly Gly Leu Leu
GAA ATG CCG CGT GAA GTG CGC GAT CTG CTG TGT GAT CCG CAA ACT TCT GGC GGT TTG CTG
1213
Leu Ala Val Met Pro Glu Ala Glu Asn Glu Val Lys Ala Thr Ala Ala Glu Phe Gly Ile
CTG GCG GTC ATG CCG GAA GCA GAA AAT GAG GTC AAA GCT ACA GCC GCC GAG TTT GCC ATT
1273
Glu Leu Thr Ala Ile Gly Glu Leu Val Pro Ala Arg Gly Gly Arg Ala Met Val Glu Ile
GAA CTG ACG GCA ATT GGC GAA CTG CTG CCA GCC CGC GGC GGT CGT GCC ATG GTT GAG ATT
1333
Arg **///** TTCAATGCGGTTGTTTATTGCCGAAAAACCGAGTCTGGCGCGCGCCATTGCTGATGCTCTGCCCAAACCGC
CGT TAA
1410
ACCGGAAAGGGCATGGCTTTATCGAGTGGCGTAATGGTCAGGTGGTGACCTGGTGTATCGGTCACTTGCTTGAGCAGGCG
1490
CAGCCAGACGCCTACGGGAGAATACCGTTGCTGCCGCCGCTGCTTAATGCCACCGCCTCAGTGGTGAGCGTCGGAAAAACG
1570
CCCCGGCGCCAGCCACAGCGTTGGCATATACTGCGCAATACCGACTGCAAATCCCACCGGAAGGCAATCAGCACAGGCG
1650
GCAACATGAGTGGGCATTTACAGT

Abbildung 25:

Nukleotidsequenz des seld Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Genprodukts.

Dargestellt ist die Sequenz des RNA-gleichen DNA-Stranges. Die Ribosomenbindestelle ist unterstrichen.

3. Genetische Charakterisierung der sela1 Mutante von *Salmonella typhimurium*

Von Kramer und Ames (66) wurde eine Mutante von *S. typhimurium*, TA4325, beschrieben, die sich in ⁷⁵Se-Markierungsversuchen und der Aktivität der Formiatdehydrogenasen identisch wie Mutante MB08 (seld) von *E. coli* verhält. Der betroffene Genort wurde mit sela bezeichnet; er kartiert bei Minute 21 des *S. typhimurium* Chromosoms. Der Genort seld in *E. coli* hingegen wurde bei Minute 38 lokalisiert (47).

Mutante TA4325 (sela1) wurde freundlicherweise von B. N. Ames zur Verfügung gestellt. Es sollte untersucht werden, ob sich ihr Defekt durch das seld Gen aus *E. coli*

komplementieren läßt. Wie die Komplementationsanalyse in TA4325 ergab, war dies überraschenderweise auch der Fall. Die erhaltenen Transformanten zeigten alle FDH₂-positiven Phänotyp.

a) Einbau von Selen durch die Mutante TA4325 mit dem plasmidkodierten seld Gen aus E. coli.

Um die Frage zu beantworten, ob das heterologe seld Genprodukt von E. coli in S. typhimurium TA4325 (sela) den Einbau von Selen in Proteine und in tRNA vermitteln kann, wurde ein ⁷⁵Se-Markierungsexperiment durchgeführt. Dazu wurden Zellen von TA4325, transformiert mit den Plasmiden pBR322 bzw. pMN330, anaerob mit bzw. ohne Nitrat angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Das Autoradiogramm der Zellextrakte nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist in Abbildung 26 zu sehen.

Wie daraus hervorgeht, konnte TA4325/pMN330 Selen in die Polypeptide der FDH₂ und FDH₁ und in tRNA einbauen. Im Extrakt von TA4325/pBR322 waren erwartungsgemäß weder markierte Selenopolypeptide noch markierte tRNA nachweisbar.

Daraus kann abgeleitet werden, daß das seld Genprodukt von E. coli und das Produkt des sela Gens aus S. typhimurium funktionell homolog sind.

b) Heterologe Hybridisierung chromosomaler DNA aus Salmonella typhimurium mit dem seld Gen aus E. coli

Um zu prüfen, ob die Gene seld aus E. coli und sela aus S. typhimurium auf DNA-Ebene Ähnlichkeit zeigen, wurden DNA-Hybridisierungsexperimente durchgeführt.

Dazu wurden 10 µg chromosomale DNA sowohl aus E. coli

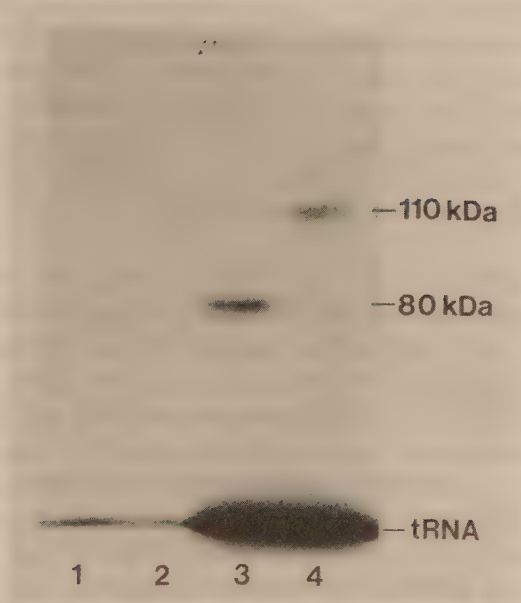


Abbildung 26:

Autoradiogramm von elektrophoretisch aufgetrennten SDS-Extrakten ^{75}Se -Selenit markierter Zellen nach anaerober Anzucht mit und ohne Nitrat.

- Spur 1: TA4325/pBR322 ohne Nitrat
- Spur 2: TA4325/pBR322 mit Nitrat
- Spur 3: TA4325/pMN330 ohne Nitrat
- Spur 4: TA4325/pMN330 mit Nitrat

MC4100 als auch aus *S. typhimurium* TL117 jeweils mit den Enzymen BamHI, EcoRI, ClaI und BstEII geschnitten. Die Fragmente wurden in 0.6 % Agarosegelen aufgetrennt und auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Als Positivkontrolle diente das seld Gen auf einem 1.2 kb BstEII Fragment aus pMN302 (siehe Abb. 23). Dieses Fragment wurde auch durch Nicktranslation mit ^{32}P markiert und als Sonde verwendet. Abbildung 27 zeigt das Autoradiogramm des Nitrocellulosefilters nach Hybridisierung.

Wie mit DNA aus *E. coli* traten auch mit DNA aus *S. typhimurium* spezifische Hybridisierungssignale auf. Die Intensität der Hybridisierungssignale mit DNA aus *S. typhimurium* war dabei nur etwas geringer. Die Hybridisierungsmuster mit Fragmenten in chromosomaler DNA aus *E. coli* und aus *S. typhimurium* waren allerdings nicht identisch. Wie aus Spur 7 hervorgeht, hybridisierte in chromosomaler DNA aus *E. coli* ein einzelnes BstEII Fragment in einer Größe von 1.2 kb, das die gleiche Größe aufweist wie das BstEII Fragment aus pMN302, der Positivkontrolle.

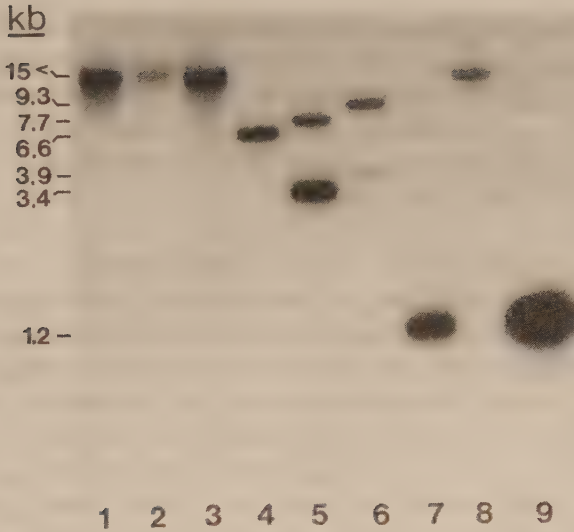


Abbildung 27:

Hybridisierung des klonierten selD Gens aus *E. coli* mit chromosomaler DNA aus *E. coli* (MC4100) und *S. typhimurium* (TL117).

DNA aus MC4100 (Spuren 1, 3, 5, 7) und TL117 (Spuren 2, 4, 6, 8) gespalten mit BamHI (1, 2), EcoRI (3, 4), ClaI (5, 6) und BstEII (7, 8). Spur 9: 1.2 kb BstEII Fragment aus pMN302.

VI. In vitro Aminoacylierung des selC Genprodukts

1. Versuche zur Bestimmung der Aminosäurespezifität des selC Genprodukts

Die bisherigen Ergebnisse haben wahrscheinlich gemacht, daß das selC Gen für eine tRNA kodiert, die den Einbau von Selenocystein in die Polypeptide der FDH_H und FDH_L vermittelt. Um einen Einblick in den Weg des Einbaus von Selenocystein zu erhalten, wurde die Aminosäurespezifität des selC Genprodukts bestimmt.

Dazu wurde Gesamt-tRNA aus einer Transformante isoliert, die das klonierte selC Gen in etwa hundert Kopien pro Zelle enthält und deshalb eine erhöhte Menge des selC Genprodukts aufweist. Gesamt-tRNA aus diesen Zellen sollte dementsprechend eine erhöhte Akzeptoraktivität für diejenige Aminosäure besitzen, mit der das selC Genprodukt beladen wird.

Zu diesem Zweck wurden Kulturen von FM420/pMN81 (selC⁺) bzw. FM420/pUC18 aerob angezogen und aus den Zellen wurde Gesamt-tRNA isoliert. Jeweils 100 µg tRNA wurden in vitro in parallelen Ansätzen quantitativ mit ¹⁴C-markierten Aminosäuren aminoacyliert. Als Enzymquelle für die Beladungsreaktionen diente ein ribosomenfreier Extrakt (S100) von MC4100. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 (selC⁺) wies im Vergleich zu der tRNA aus FM420/pUC18 eine stark erhöhte Akzeptorkapazität für die Aminosäure L-Serin auf. Für keine der neun weiteren getesteten Aminosäuren war ein vergleichbarer Unterschied in der Beladung nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die durch selC kodierte tRNA mit der Aminosäure L-Serin beladen wird.

Tabelle 5: Bestimmung der Aminosäurespezifität des selC Genprodukts

Aminosäure	Akzeptoraktivität ^a von Gesamt-tRNA	
	FM420/pUC18	FM420/pMN81 (<u>selC</u> ⁺)
Ser	33	217
Cys	32	29
Trp	101	106
Gly	76	88
Ala	85	96
Glu	47	39
Asp	92	84
Leu	144	117
Phe	72	90
Thr	38	36

a) pmol Aminosäure x 100 µg Gesamt-tRNA⁻¹

Von Tappel und Mitarbeitern (51) war nun jedoch beschrieben worden, daß Selenocystein direkt und per se mit einer tRNA-Spezies verestert wird. Deshalb mußte auch die Möglichkeit untersucht werden, ob selC tRNA mit Selenocystein beladen werden kann. Da radioaktives Selenocystein nicht zur Verfügung stand, wurde geprüft, ob ¹⁴C-markiertes Serin durch Selenocystein in der Beladungsreaktion verdrängt werden kann. Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 wurde dazu in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Selenocystein mit ¹⁴C-Serin verestert. Die Versuche wurden unter anaeroben Bedingungen

durchgeführt, um eine Oxidation des zugesetzten Selenocysteins zu Selenocystin zu verhindern. Tab. 6 zeigt die erhaltenen Resultate.

Tabelle 6: Beladung der Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 (selC^a) mit L-¹⁴C-Serin in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Selenocystein bzw. O-Phosphoserin

Zugabe ^a		Akzeptoraktivität ^b für L-Serin
L-Selenocystein	O-Phosphoserin	
-	-	214
20 µM	-	213
40 µM	-	220
100 µM	-	213
200 µM	-	218
-	20 µM	208
-	40 µM	212
-	100 µM	194
-	200 µM	176

- a) Angegeben sind die Endkonzentrationen im Versuchsansatz.
Die Endkonzentration von L-¹⁴C-Serin betrug 20 µM.
- b) pmol Serin x 100 µg Gesamt-tRNA⁻¹

Die Aminoacylierung mit Serin wurde durch die Anwesenheit steigender Konzentrationen an Selenocystein im Versuchsansatz in keiner Weise beeinflusst. Das selC Genprodukt wird

also nicht mit Selenocystein beladen.

Analog dazu wurde analysiert, ob markiertes Serin durch O-Phosphoserin in der Beladungsreaktion verdrängt werden kann. Wie aus Tabelle 6 entnommen werden kann, war keine signifikante Abnahme der Beladung feststellbar.

Von Low et al. (73) wurde eine Mutante, KL235, isoliert, die eine temperaturlabile Seryl-tRNA-Synthetase synthetisiert; diese kann durch Inkubation bei 45°C inaktiviert werden. Mit Hilfe dieser Mutante wurde untersucht, ob die von selC kodierte tRNA durch die "normale" Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen wird. Dazu wurde in die tRNA-Aminoacylierungsreaktion ein S100-Extrakt eingesetzt, der vor Zugabe zum Reaktionsansatz 20 min lang bei 45°C inkubiert worden war. Als Kontrolle diente ein nicht vorinkubierter Extrakt.

Wie Tabelle 7 zeigt, ließ sich ohne vorherige Inaktivierung der mutierten Seryl-tRNA-Synthetase die erhöhte Akzeptoraktivität der Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 nachweisen. Die Hitzeinaktivierung der mutierten Seryl-tRNA-Synthetase hatte zur Folge, daß Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 und FM420/pUC18 nicht mehr mit ^{14}C -Serin beladen werden konnte. Die Aktivität der Phenylalanyl- bzw. Leucyl-tRNA-Synthetase war nach Hitzebehandlung des Extrakts kaum erniedrigt.

Folgende Schlüsse können daraus gezogen werden:

- 1.) Die durch selC kodierte tRNA_{UCA} ist für die Aminosäure L-Serin spezifisch.
- 2.) Die tRNA_{UCA} wird durch die Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen.

Tabelle 7: Beladung des selC Genprodukts durch die Seryl-tRNA-Synthetase

Vorinkubation des S100-Extrakts von	Aminosäure	pmol Aminosäure x 100 µg Gesamt-tRNA ⁻¹	
		FM420/pUC18	FM420/pMN81 (<u>selC</u> ⁺)
KL235 (<u>serS</u>)			
-	Ser	24	200
20 min 45°C	Ser	0.9	2
-	Phe	72	76
20 min 45°C	Phe	65	67
-	Leu	121	97
20 min 45°C	Leu	119	96

2. Einfluß von Mutationen in selC auf die Beladung

Ein Basenaustausch von G₇₁ (selC⁺) nach A₇₁ (selC⁺) hat in Mutante MB07 den Ausfall des Seleneinbaus in Proteine zur Folge. Es war nun interessant zu wissen, ob das mutierte Genprodukt noch mit Serin beladen werden kann. Untersucht wurde deshalb, ob Gesamt-tRNA aus FM420/pMN2072 (selC⁺) wie diejenige aus FM420/pMN81 (selC⁺) eine erhöhte Akzeptoraktivität für Serin aufweist. Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, ist das jedoch nicht der Fall.

Analog dazu wurde auch analysiert, ob die in vitro eingeführten Insertionen in das plasmidkodierte selC⁺ Gen (vgl. Kapitel III.3) die Akzeptoraktivität der mutierten Genprodukte verändern. Wie Tabelle 8 zeigt, war die Akzeptorkapazität der Gesamt-tRNA aus FM420/pMN111 und FM420/pMN120

für Serin gegenüber der Kontrolle jedoch ebenfalls nicht signifikant erhöht. Die Steigerung der Akzeptorkapazität für L-Serin fiel dabei im Falle von tRNA aus FM420/pMN73 nicht so deutlich aus wie mit tRNA aus FM420/pMN81. Dies läßt sich durch die unterschiedliche Kopienzahl des klonierten selC Gens erklären: pMN81 (Vektor: pUC18) kommt im Vergleich zu pMN73 (Vektor: pACYC184) in einer etwa zehnfach höheren Plasmidkopienzahl vor (13, 130).

Tabelle 8: Aminoacylierung mutierter selC Genprodukte mit L-Serin

Plasmid	Akzeptoraktivität ^a			
	Ser	Leu	Glu	Gly
pUC18	113	166	89	155
pMN81 (<u>selC</u> ⁺)	603	172	n.b.	n.b.
pMN2072 (<u>selC</u> ⁺)	100	123	96	160
pMN73 (<u>selC</u> ⁺)	187	178	116	202
pMN111 (<u>selC</u> ⁴)	136	164	114	185
pMN120 (<u>selC</u> ::Q)	114	151	94	171

n.b.) nicht bestimmt

a) pmol Aminosäure x 100 µg Gesamt-tRNA⁻¹ aus FM420 transformiert mit verschiedenen Plasmiden

Es bleibt damit festzuhalten, daß sowohl die Transition von G₇₁ nach A₇₁ in selC als auch die in vitro erzeugten In-

sertionen in selC die Beladung der veränderten Genprodukte mit Serin verhindern; als Folge kommt es zu keinem Einbau von Selenocystein in die Polypeptide der FDH₂ und FDH₁.

3. Einfluß von selA, selB und selD Mutationen auf die Beladung des selC Genprodukts

Die Gene selA, selB und selD sind essentiell für die Selenierung der Polypeptide von FDH₂ und FDH₁. Eine Möglichkeit war, daß Mutationen in diesen Genen einen Einfluß auf die Beladung des selC Genprodukts durch die Seryl-tRNA-Synthetase ausüben.

Um dies auszuschließen, wurden S100-Extrakte der E. coli Stämme WL30153 (Δ selAB) und MB08 (selD) für die Aminoacylierung von Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 (selC⁺) und FM420/pUC18 mit ¹⁴C-Serin verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9: Aminoacylierung des selC Genprodukts mit S100-Überständen von WL31153 (Δ selAB) und MB08 (selD)

S100-Extrakt	pmol L-Serin x 100 µg Gesamt-tRNA ⁻¹	
	FM420/pUC18	FM420/pMN81
MC4100 (<u>sel</u> ⁺)	38	214
WL31153 (Δ <u>selAB</u>)	30	197
MB08 (<u>selD</u>)	35	230

Die erhöhte Akzeptorkapazität der Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 für Serin im Vergleich zur Kontrolle, war auch bei Aminoacylierung mit Extrakten aus den Mutanten WL30153 und MB08 nachweisbar. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die Produkte der Gene selA, selB und selD für die Beladung der selC kodierten tRNA mit L-Serin erforderlich sind.

VII. Nachweis des in vivo Vorkommens von Selenocysteyl-tRNA_{UCA}

Aus den Ergebnissen der ^{75}Se -Markierungsexperimente wurde abgeleitet, daß die durch selC kodierte tRNA_{UCA} am Einbau von Selenocystein in Protein beteiligt ist. Die Ergebnisse der in vitro Beladungsstudien hatten gezeigt, daß die tRNA_{UCA} durch die Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen wird. Daraus kann gefolgert werden, daß Seryl-tRNA_{UCA} ein Zwischenprodukt in der Synthese von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} darstellt. Um dies zu erhärten, wurde nun als nächstes versucht, das in vivo Vorkommen von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} nachzuweisen.

- Nachweis von Selenocystein nach Derivatisierung

Kulturen von FM420/pMN81 (selC⁺) und FM420/pUC18 wurden anaerob angezogen und mit ^{75}Se -Selenit markiert. Aus den Zellen wurde unter anaeroben Bedingungen aminoacylierte Gesamt-tRNA isoliert und durch alkalische Hydrolyse (pH 8.5) deacyliert. Anschließend wurde dem Hydrolysat in drei Ansätzen Jodacetamid, Jodacetat oder 4-Vinylpyridin zugesetzt. Nach Inkubation wurde das jeweilige Reaktionsgemisch zusammen mit entsprechend derivatisiertem, authentischem Selenocystein unter anaeroben Bedingungen dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Derivate von ^{75}Se -Selenocystein wurden mittels Autoradiographie und die Derivate von authentischem Selenocystein mit Ninhydrin nachgewiesen. In Abbildung 28 B, C, D, ist das Ergebnis zu sehen.

Im alkalischen Hydrolysat der tRNA aus FM420/pMN81 war eine zusätzliche selenhaltige Komponente nachweisbar. Die Derivate dieser selenhaltigen Verbindung wandern im Chromatogramm an die gleichen Positionen wie die Derivate von authentischem Selenocystein. Nach Behandlung des authentischen Selenocysteins und des alkalischen Hydrolysats der Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 mit Jodacetat traten zwei

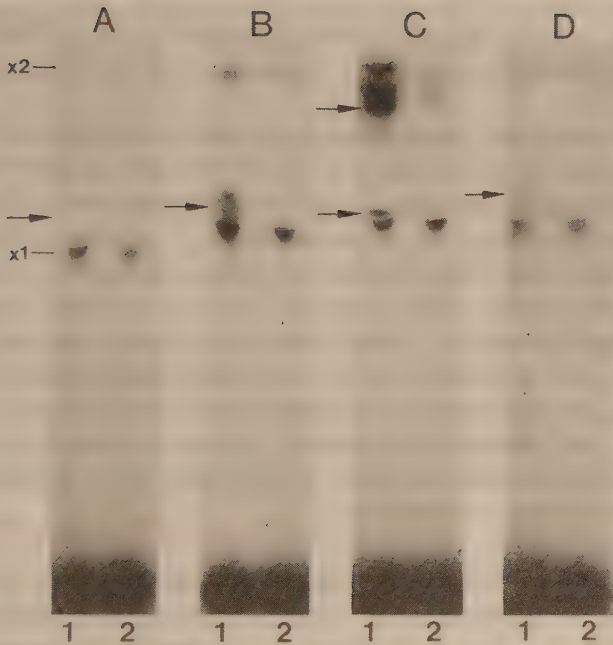


Abbildung 28:

Autoradiogramm dünn-schichtchromatographisch aufgetrennter tRNA aus ^{75}Se -Selenit markierten Zellen von FM420/pMN81 (selC⁺), (Spuren 1) und FM420/pUC18 (Spuren 2).

- A) tRNA (pH 6.5) nach Jodacetamid-Behandlung (ohne Hydrolyse)
- B) tRNA nach Deacylierung (pH 8.5) und Jodacetamid-Behandlung des Hydrolysats
- C) tRNA nach Deacylierung (pH 8.5) und Jodacetat-Behandlung des Hydrolysats
- D) tRNA nach Deacylierung (pH 8.5) und 4-Vinylpyridin-Behandlung des Hydrolysats

Die Positionen, an die entsprechende Derivate von authentischem Selenocystein wanderten, sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. x1 und x2 bezeichnen nicht identifizierte selenhaltige Komponenten.

Derivate auf, die jeweils das gleiche Laufverhalten zeigten. Zusammen lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, daß es sich bei der selenhaltigen Komponente um ^{75}Se -Selenocystein handelt.

In einem weiteren Experiment wurde daher geprüft, ob das in FM420/pMN81 nachweisbare ^{75}Se -Selenocystein in der Tat mit tRNA verestert vorliegt. Um die Hydrolyse der Aminoacyl-tRNA-Esterbindung zu unterdrücken, wurde die aus FM420/pMN81 und FM420/pUC18 isolierte, aminoacylierte tRNA in einem schwach sauren Puffer (pH 6.5) gelöst, und mit Jodacetamid versetzt. Nach Inkubation wurde das Reaktionsgemisch dann zusammen mit entsprechend alkyliertem, authentischem Selenocystein dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und autoradiographiert. Wie Abbildung 28 A zeigt, war ohne vorherige alkalische Hydrolyse kein ^{75}Se -Selenocystein-Derivat nachweisbar.

Eine milde alkalische Behandlung der aminoacylierten tRNA ist also erforderlich, um freies Selenocystein zu erhalten. Dies beweist, daß die Aminosäure ^{75}Se -Selenocystein in der Zelle über eine Esterbindung an tRNA gebunden vorliegt.

Wie aus den verschiedenen Autoradiogrammen hervorgeht, war jeweils nur im alkalischen Hydrolysat der aminoacylierten Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 (selC') Selenocystein nachweisbar. Im Kontrollstamm FM420/pUC18 konnte Selenocystein nur nach sehr langer Exponierdauer nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Dieser Unterschied beruht demnach auf der hohen Kopienzahl des klonierten selC Gens und der dadurch gesteigerte Synthese der selC tRNA.

Unabhängig von der Kopienzahl des selC Gens inkorporierten FM420/pUC18 und FM420/pMN81 in etwa gleichem Umfang ^{75}Se in tRNA^{lys} bzw. tRNA^{glu} (zu erkennen an der Schwärzung des Films am Auftragspunkt des Chromatogramms) und in eine als x1 bezeichnete Komponente. Diese Selen-Komponente konnte

keiner der zur Verfügung stehenden Selenverbindungen (Selenit, Selenomethionin, Selenocyst(e)in) zugeordnet werden. Die als x2 bezeichnete Komponente ist wohl ein Nebenprodukt der verschiedenen Alkylierungsreaktionen.

- Nachweis von Selenocystein als Selenocystin

Kulturen von FM420/pMN81 (selC⁺) und FM420/pUC18 wurden anaerob angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Aus den Zellen wurde aminoacylierte tRNA isoliert und durch alkalische Hydrolyse deacyliert. Anschließend wurde authentisches Selenocystein zugegeben, und das Gemisch an Luftsauerstoff (zu Selenocystin) oxidiert. Nach Auftrennung des Hydrolysats über Dünnschichtchromatographie (an Luft) wurde die Co-Chromatographie von ⁷⁵Selenocystin und authentischem Selenocystin nachgewiesen. In Abbildung 29 ist das Ergebnis zu sehen.

Wiederum war im alkalischen Hydrolysat der tRNA aus FM420/pMN81 eine zusätzliche selenhaltige Verbindung nachweisbar. Der R_f-Wert dieser Verbindung war identisch mit dem von authentischem Selenocystin.



Abbildung 29:

Autoradiogramm dünnenschichtchromatographisch aufgetrennter tRNA aus ^{75}Se -Selenit markierten Zellen von FM420/pMN81 (selC⁺), (Spur 1) und FM420/pUC18 (Spur 2).

Aminoacylierte tRNA wurde deacyliert (pH 8.5), und nach Zugabe von authentischem Selenocystein wurde das Gemisch an Luftsauerstoff oxidiert und aerob dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Laufposition von authentischem Selenocystin ist mit einem Pfeil gekennzeichnet; x1: nicht identifizierte selenhaltige Komponente.

VIII. Einfluß von Mutationen in selA, selB und selD auf die Bildung von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} in vivo

Die beschriebenen Ergebnisse der in vitro Beladungsversuche schließen eine Beteiligung der Genprodukte von selA, selB und selD an der Aminoacylierung der tRNA_{UCA} mit Serin aus. Um einen Hinweis auf die Funktion dieser Genprodukte zu erhalten, wurde nun untersucht, welche Auswirkung Mutationen in diesen Genen auf die Bildung von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} haben.

Da eine erhöhte Gen-Dosis von selC den Nachweis von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} ermöglicht, wurden Kulturen der verschiedenen sel Mutanten, die pMN81 (selC') enthielten, anaerob angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Aus den Zellen wurde aminoacylierte tRNA isoliert, und anschließend mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie auf den Gehalt an ⁷⁵Se-Selenocysteyl-tRNA_{UCA} überprüft. Als Vergleich diente jeweils die Menge an ⁷⁵Se-Selenocysteyl-tRNA_{UCA}, die ein isogener sel' Stamm mit dem Plasmid pMN81 (selC') oder mit pUC18 synthetisierte.

- Mutation in selD

Zellen von MB08 (selD), transformiert mit pMN81, und von EMG29 (sel'), transformiert mit pMN81 bzw. pUC18, wurden anaerob angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Aus den Zellen wurde unter anaeroben Bedingungen aminoacylierte Gesamt-tRNA isoliert und in zwei Fraktionen geteilt. Ein Teil der aminoacylierten tRNA wurde durch alkalische Hydrolyse (pH 8.5) deacyliert, und das Hydrolysat wurde mit Jodacetamid alkyliert. Der andere Teil der aminoacylierten tRNA wurde zur Kontrolle ohne vorherige alkalische Hydrolyse bei pH 6.5 mit Jodacetamid behandelt. Die Reaktionsgemische wurden jeweils mit entsprechend derivatisiertem, authentischem Selenocystein vermischt, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und autoradiographiert (Abb. 30).



Abbildung 30:

Autoradiogramm dünn-schichtchromatographisch aufgetrennter tRNA aus ^{75}Se -Selenit markierten Zellen.

- A) tRNA (pH 6.5) nach Jodacetamid-Behandlung (ohne Hydrolyse)
- B) tRNA nach Deacylierung (pH 8.5) und Jodacetamid-Behandlung des Hydrolysats

Spuren 1: MB08 (selD)/pMN81 (selC⁺)
 Spuren 2: EMG29 (sel⁺)/pMN81 (selC⁺)
 Spuren 3: EMG29 (sel⁺)/pUC18

Die Laufposition des Derivats von authentischem Selenocystein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet; x1, x2: nicht identifizierte selenhaltige Komponenten.

Im Gegensatz zu EMG29/pMN81 war in der Mutante MB08/pMN81 trotz erhöhter selC Genkopienzahl kein aminoacyliertes Selenocystein nachweisbar. Daneben fehlte in MB08/pMN81, wie erwartet auch der Einbau von Selen in tRNA^{Val} und tRNA^{Met} und in die als x1 bezeichnete Komponente. Wie schon in FM420 beobachtet, ging auch in EMG29 die Erhöhung der selC Gen dosis mit einer Erhöhung der Menge von tRNA-gebundenem Selenocystein einher.

- Mutationen in selA und selB

In Zellen von E. coli WL31153 (Δ selAB), die bereits entweder Plasmid pWL171 (selA*) oder Plasmid pWL101 (selB*) enthielten, wurde jeweils das kompatible Plasmid pMN81 (selC*) transformiert. Kulturen der Transformanten wurden anaerob angezogen und mit ⁷⁵Se-Selenit markiert. Als Vergleich diente der isogene sel* Stamm FM420 mit pMN81 bzw. pUC18 transformiert. Aus den Zellen wurde die aminoacylierte Gesamt-tRNA isoliert und auf den Gehalt an Selenocysteyl-tRNA^{Uca} überprüft. Das Autoradiogramm ist in Abbildung 31 zu sehen.

WL31153 (Δ selAB) konnte in Anwesenheit der plasmidkodierten Gene selB* und selC* kein mit tRNA^{Uca} verestertes Selenocystein synthetisieren. Überraschenderweise wurde aber von der Mutante WL31153 (Δ selAB) in Anwesenheit der plasmidkodierten Gene selA* und selC* Selenocysteyl-tRNA^{Uca} gebildet. Die Menge an tRNA-gebundenem Selenocystein war sogar deutlich höher als in der Kontrolle FM420/pMN81.

Es wurde nun untersucht, ob der erhöhte Spiegel allein auf die selB Mutation oder zumindest zum Teil auch auf der erhöhten Gen-Dosis von selA beruht. Um diese Frage zu beantworten wurde die Mutante GY12 verwendet, die eine Mutation in selB aufweist, und ein intaktes, chromosomal kodiertes selA Gen besitzt.

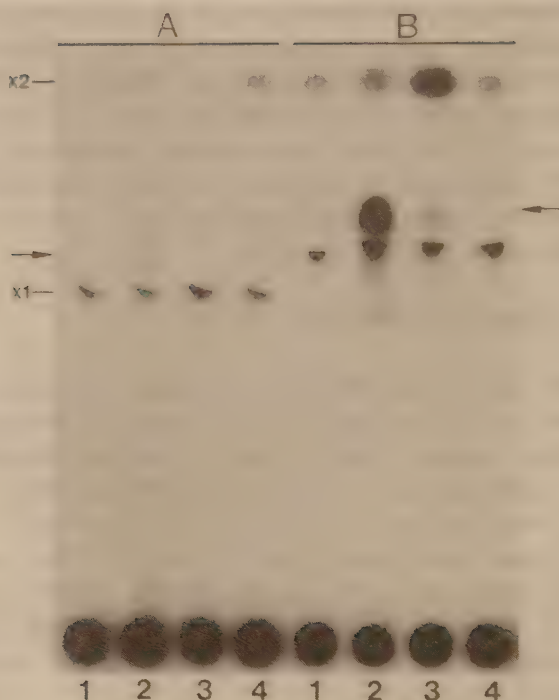


Abbildung 31:

Autoradiogramm dünnenschichtchromatographisch aufgetrennter tRNA aus ^{75}Se -Selenit markierten Zellen.

- A) tRNA (pH 6.5) nach Jodacetamid-Behandlung (ohne Hydrolyse)
 B) tRNA nach Deacylierung (pH 8.5) und Jodacetamid-Behandlung des Hydrolysats

Spuren 1: WL31153 (ΔselAB)/pWL101 (selB^+)/pMN81 (selC^+)
 Spuren 2: WL31153 (ΔselAB)/pWL171 (selA^+)/pMN81 (selC^+)
 Spuren 3: FM420 (sel^+)/pMN81 (selC^+)
 Spuren 4: FM420 (sel^+)/pUC18

Die Laufposition des Derivats von authentischem Selenocystein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet; x1, x2: nicht identifizierte selenhaltige Komponenten.

Kulturen von GY12/pMN81 und dem isogenen Stamm EMG29/pMN81 wurden anaerob angezogen, und mit ^{75}Se -Selenit markiert. Das Autoradiogramm nach Dünnschichtchromatographie der isolierten tRNA ist in Abbildung 32 zu sehen.

Im Vergleich zum Referenzstamm EMG29/pMN81 zeigte die selB Mutante GY12/pMN81 eine erhöhte Menge an Selenocysteyl-tRNA_{UCA}. Die hier beobachtete Anhäufung kann demnach allein der selB Mutation zugeschrieben werden. Andererseits war aber die Menge an Selenocystein deutlich geringer als diejenige, die WL31153/pMN81 in Anwesenheit des plasmidkodierten selA Gens aufwies. Demnach läßt sich der Gehalt an Selenocysteyl-tRNA_{UCA} durch eine erhöhte Syntheserate von Selenocystein, die vermutlich dem Gen-Dosis-Effekt des plasmidkodierten selA Gens zuzuschreiben ist, steigern.

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- 1) Die Genprodukte von selA und selD sind für die Bildung von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} notwendig.
- 2) Das selB Genprodukt hingegen ist an der Bildung von Selenocysteyl-tRNA nicht beteiligt.

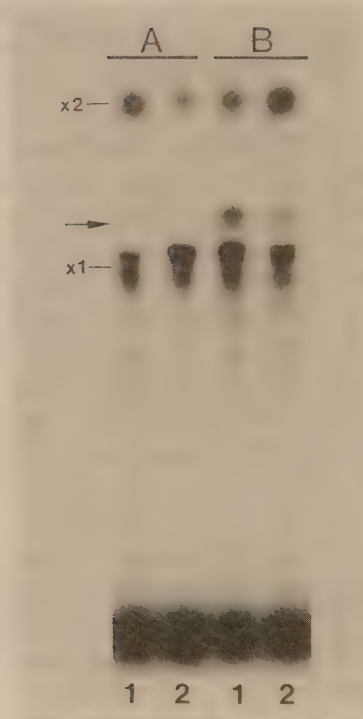


Abbildung 32:

Autoradiogramm dünnstschichtchromatographisch aufgetrennter tRNA aus ^{75}Se -Selenit markierten Zellen von GY12 (selB)/pMN81 (selC⁺) (Spuren 1) und EMG29 (sel⁺)/pMN81 (selC⁺) (Spuren 2).

- A) tRNA (pH 6.5) nach Jodacetamid-Behandlung (ohne Hydrolyse)
- B) tRNA nach Deacylierung (pH 8.5) und anschließender Jodacetamid-Behandlung des Hydrolysats bei pH 6.5.

Die Laufposition des Derivats von authentischem Selenocystein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet; x1, x2: nicht identifizierte selenhaltige Komponenten.

IX. In vitro Umwandlung von Seryl-tRNA_{UCA} in Selenocysteyl-tRNA_{UCA}

Die beschriebenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die durch selC kodierte tRNA in vivo mit Selenocystein verestert ist. Die Ergebnisse der in vitro Beladung zeigten jedoch andererseits, daß diese tRNA mit Serin und nicht mit Selenocystein beladen wird. Diese Befunde führen zu der Annahme, daß Serin nach Aminoacylierung in Selenocystein umgewandelt wird. Als nächstes wurde daher versucht, Seryl-tRNA_{UCA} in vitro in Selenocysteyl-tRNA_{UCA} umzuwandeln.

1. Enzymatische Umwandlung von Serin in Selenocystein

Für diese Experimente wurde Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81, die einen erhöhten Gehalt an selC kodierter tRNA aufweist, in einem ersten Schritt in vitro mit ¹⁴C-Serin beladen. Die mit ¹⁴C-Serin aminoacylierte Gesamt-tRNA, wurde als Substrat in die Umwandlungsexperimente eingesetzt.

Als Enzymquelle für die Umwandlungsreaktion dienten 100 000 x g Überstände von Zellen, die unter anaeroben Bedingungen angezogen wurden. Die Präparation des Extrakts erfolgte ebenfalls unter anaeroben Bedingungen, da nicht bekannt war, ob die an der Reaktion beteiligten Enzyme gegenüber Sauerstoff empfindlich sind. Die erhaltenen S100-Extrakte wurden durch Gelfiltration an Sephadex G25 von niedermolekularen Bestandteilen befreit (S100/G25-Extrakt).

Für die ersten Experimente wurde ein S100/G25-Extrakt aus MC4100 verwendet. Als "Selen-Donor" für die Umwandlung von Serin in Selenocystein diente nicht-radioaktives Selenocystein.

Mit ¹⁴C-Serin aminoacylierte Gesamt-tRNA (50 µg) wurde anaerob mit S100/G25-Extrakt aus MC4100 (100 µg Protein)

und Selenocystein (450 pmol) 30 min lang bei 28°C unter den in "Material und Methoden" angegebenen Bedingungen inkubiert. Nach der Reaktion wurde die aminoacylierte tRNA isoliert und durch alkalische Hydrolyse deacyliert. Dem Hydrolysat wurde authentisches Selenocystein zugesetzt, und das Gemisch wurde an Luftsauerstoff (zu Selenocystin) oxidiert und durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Authentisches Selenocystin wurde mittels Ninhydrin nachgewiesen. Nach Analyse der Reaktionsprodukte durch Autoradiographie war jedoch kein ^{14}C -Selenocystin nachweisbar (nicht gezeigt).

Die Versuche zum Einfluß von Mutationen in den Genen sela und seld auf die Bildung von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} haben gezeigt, daß die Produkte beider Gene für die Synthese von Selenocystein notwendig sind. Es bestand deshalb die Möglichkeit, daß diese Genprodukte zwar an der Konversion von Serin in Selenocystein beteiligt sind, daß aber die Menge an Sela und/oder Seld Protein in Extrakten aus Wildtypzellen limitierend ist.

Es wurde deshalb versucht, mit S100-Extrakten aus Zellen, die das Sela bzw. Seld Protein überproduzieren, eine Umwandlung von Serin zu erreichen. Um die Syntheserate von Sela bzw. Seld zu steigern, wurde das T7-Expressionssystem verwendet.

In einem ersten Experiment wurde das in den Vektor pT7-6 klonierte sela Gen (pWL187) in K38/pGP1-2 exprimiert. Dazu wurde K38/pGP1-2/pWL187 anaerob bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 angezogen. Nach Induktion der Expression wurde die Kultur bei 37°C 1 h lang weiterinkubiert. Auch in diesem Experiment konnte jedoch keine Umwandlung von Serin in Selenocystein erreicht werden.

Zum Erfolg führte schließlich die Verwendung eines

Extrakts, der sowohl überproduziertes Sela als auch Seld Protein enthielt. Das für die Expression von seld erforderliche, rekombinante T7-Plasmid (pMN340) wurde von B. Veprek zur Verfügung gestellt. Zur Konstruktion von pMN340 war das seld Gen auf einem 1.2 kb BstEII Fragment aus pMN302 (vgl. Abb. 23) in den Vektor pT7-6 (gespalten mit SmaI) kloniert worden (B. Veprek, persönl. Mitteilung).

Nach Expression von sela (pWL187) bzw. seld (pMN340) in K38/pGP1-2 wurden die Zellen gemischt. Anschließend wurde ein S100/G25-Extrakt (Sela+D-Extrakt) präpariert. 100 µg Protein des Sela+D-Extrakts wurden mit 50 µg ¹⁴C-Serin beladener Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 und Selenocystein anaerob für 30 min bei 28°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze, in denen entweder kein Sela+D-Extrakt oder kein Selenocystein als Selen-Donor zugegeben wurde. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse zu sehen.

Sie zeigen, daß die Umwandlung von Serin in Selenocystein (nachgewiesen als Selenocystin) ausschließlich nach Zugabe von Sela+D-Extrakt und Selen-Donor (Spur 5) erfolgte. Selenocystein war nicht nachweisbar, wenn die Ansätze entweder keinen Selen-Donor (Spur 3) oder keinen Sela+D-Extrakt (Spur 4) enthielten. In Spur 1 bzw. 2 wurde Substrat, bzw. das Endprodukt der Umwandlungsreaktion jeweils ohne vorherige alkalische Hydrolyse der Aminoacyl-tRNA-Esterbindung dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und autoradiographiert. Weder markiertes Serin noch markiertes Selenocystein konnte dann im Chromatogramm an entsprechender Position nachgewiesen werden. Dies beweist, daß sowohl das in die Umwandlungsreaktion eingesetzte Serin als auch das gebildete Selenocystein mit tRNA verestert ist. Wie in Spur 1 und 2 weiter zu sehen ist, tritt ohne alkalische Hydrolyse das mit "T" bezeichnete Signal nicht

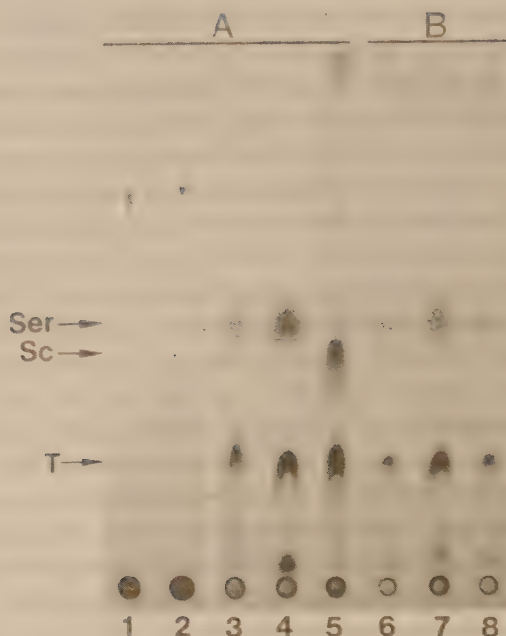


Abbildung 33:

Umwandlung von Seryl-tRNA_{UCA} in Selenocysteyl-tRNA_{UCA}.

- A. Spuren 1 bis 5:** ¹⁴C-Serin beladene Gesamt-tRNA (50 µg) aus FM420/pMN81 (selC⁺) 30 min bei 28°C inkubiert mit:
- Spur 1: ohne Zusatz
 - Spuren 2 u. 5: 100 µg Protein eines Sela+D-Extrakts plus 450 pmol Selenocystein
 - Spur 3: 100 µg Protein eines Sela+D-Extrakts
 - Spur 4: 450 pmol Selenocystein
- B. Spuren 6 bis 8:** ¹⁴C-Serin beladene Gesamt-tRNA aus MN1 (selC⁺) (50 µg) 30 min bei 28°C inkubiert mit:
- Spur 6: 100 µg Protein eines Sela+D-Extrakts
 - Spur 7: 450 pmol Selenocystein
 - Spur 8: 100 µg Protein eines Sela+D-Extrakts plus 450 pmol Selenocystein

Aminoacylierte tRNA wurde nicht deacyliert (pH 6.5, Spuren 1 + 2) bzw. deacyliert (pH 8.5, Spuren 3 - 8), und nach Zugabe von authentischem Selenocystein wurde das jeweilige Gemisch aerob dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und autoradiographiert.

Abkürzungen: Sc, Selenocystin; Ser, Serin; T, Nebenprodukt der Deacylierung in Tris/Cl Puffer.

auf. Komponente "T" scheint ein Nebenprodukt der Deacylierungsreaktion (in Tris/Cl-Puffer) zu sein. Erfolgt die Deacylierung der aminoacylierten tRNA nämlich in Ammoniumcarbonatpuffer, ist "T" nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt).

Als nächstes wurde untersucht, ob ausschließlich mit tRNA_{UCA} verestertes Serin in Selenocystein umgewandelt wird. Dazu wurde Gesamt-tRNA aus MN1 (selC*) isoliert, dessen selC* Genprodukt nicht mit Serin beladbar ist. Die Gesamt-tRNA wurde mit ¹⁴C-Serin unter Acylierungsbedingungen inkubiert und dann mit Selen-Donor und SelA+D-Extrakt versetzt.

Wie in Abbildung 33 Spur 8 zu sehen ist, war dabei keine Umwandlung von Serin in Selenocystein erkennbar.

Um nun weiter zu prüfen, ob es sich bei der Konversion von Seryl-tRNA_{UCA} in Selenocysteyl-tRNA_{UCA} um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt.

Im ersten Experiment wurde der SelA+D-Extrakt vor Zugabe zum Reaktionsansatz 5 min lang auf 95°C erhitzt.

Im zweiten Experiment wurde der SelA+D-Extrakt für 1 h bei 37°C mit Proteinase K (4 µg/100 µg Extraktprotein) vorinkubiert. Als Kontrolle diente ein Extrakt, der ohne Proteinase K für 1 h bei 37°C präinkubiert wurde. Abbildung 34 zeigt das Autoradiogramm.

Sowohl nach Hitzeinaktivierung als auch nach Behandlung des zellfreien Extrakts mit Proteinase K war keine Umwandlung von Serin in Selenocystein mehr erkennbar. Der Extrakt, der in Abwesenheit von Proteinase K für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, zeigte hingegen normale katalytische Aktivität.

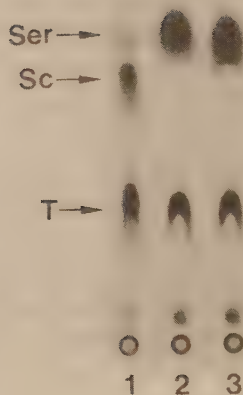


Abbildung 34:

Enzymatische Umwandlung von Seryl-tRNA^{ser} in Selenocysteyl-tRNA^{ser}

In vitro mit ¹⁴C-Serin beladene Gesamt-tRNA (50 µg) aus FM420/pMN81 (selC⁺) 30 min bei 28°C inkubiert mit 450 pmol Selenocystein und:

Spur 1: 100 µg Protein des SelA+D-Extrakts, vorinkubiert für 1 h bei 37°C

Spur 2: 100 µg Protein des SelA+D-Extrakts, vorinkubiert für 1 h bei 37°C mit Proteinase K (4 µg/100 µg Protein des Extrakts)

Spur 3: 100 µg Protein des SelA+D-Extrakts, vorinkubiert für 5 min bei 95°C

Aminoacylierte tRNA wurde isoliert, deacyliert (pH 8.5) und nach Zugabe von authentischem Selenocystein wurde das Gemisch dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und autoradiographiert.

Abkürzungen: Sc, Selenocystin; Ser, Serin; T, Nebenprodukt der Deacylierung in Tris/Cl Puffer.

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- 1.) Serin kann in vitro an der tRNA_{UCA} in Selenocystein umgewandelt werden, wenn der verwendete Extrakt einen erhöhten Gehalt an SclA und SclD Protein aufweist.
- 2.) Die Umwandlung von Serin in Selenocystein wird enzymatisch katalysiert.
- 3.) Die Umwandlungsreaktion ist substratspezifisch. Es wird nur Serin, das mit tRNA_{UCA} verestert ist, in Selenocystein umgewandelt.

2. Abhängigkeit der Selenocysteyl-tRNA Bildung von der Art des Selen-Donors

Es ist nicht bekannt, in welcher Form reduziertes Selen in der Zelle für die Synthese von Selenocystein verwendet wird. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, wurde untersucht, ob in vitro neben Selenocystein auch Selenit, Selenid oder Selenomethionin für die Umwandlung von Serin in Selenocystein verwertet werden können. Entsprechend wurden den Reaktionsansätzen anstelle von Selenocystein 450 pmol Selenit, Selenid bzw. Selenomethionin zugesetzt.

Wie aus Abbildung 35 A hervorgeht, konnte unter den gewählten Bedingungen neben Selenid überraschenderweise auch Selenit als Selen-Donor verwertet werden. Nach Zugabe von Selenomethionin war hingegen keine Umwandlung von Serin in Selenocystein erkennbar. Da Selenit als Selen-Donor dienen kann, wurde auch ⁷⁵Se-Selenit (450 pmol, 150 µCi/µmol) eingesetzt. Als Substrat wurde in diesem Experiment Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 verwendet, die vorher in vitro mit nicht markiertem Serin beladen worden war.

Wie aus Abbildung 35 B entnommen werden kann, zeigte das

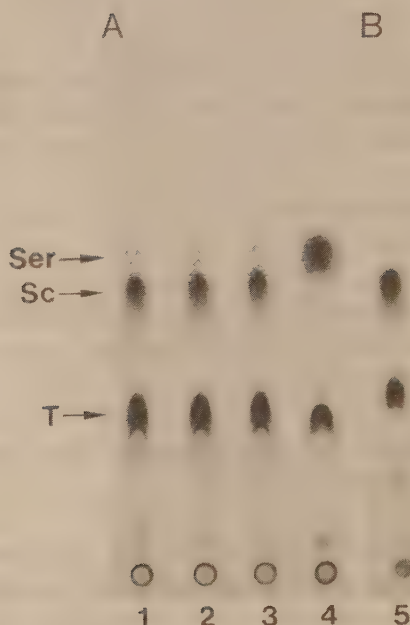


Abbildung 35:

Umwandlung von Seryl-tRNA^{Ser} in Selenocysteyl-tRNA^{Ser} bei Verwendung verschiedener Selen-Donoren.

- A) In vitro mit ¹⁴C-Serin beladene Gesamt-tRNA (50 µg) aus FM420/pMN81 (selC⁺) 30 min bei 28°C inkubiert mit 100 µg Protein eines SelaA-D-Extrakts und 450 pmol Selenocystein (Spur 1), Selenid (Spur 2), Selenit (Spur 3), Selenomethionin (Spur 4).
- B) In vitro mit nicht markiertem Serin beladene Gesamt-tRNA (50 µg) aus FM420/pMN81 (selC⁺) 30 min bei 28°C inkubiert mit 100 µg Protein eines SelaA-D-Extrakts und 450 pmol ⁷⁵Se-Selenit (150 µCi/µmol).

Abkürzungen: Sc, Selenocystin; Ser, Serin; T, Nebenprodukt der Deacylierung in Tris/Cl Puffer.

gebildete ^{75}Se -Selenocystein nach Oxidation zu ^{75}Se -Selenocystin das gleiche Laufverhalten, wie authentisches Selenocystin.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde in einem weiteren Experiment analysiert, ob die Umwandlungsreaktion von dem im Reaktionsansatz vorhandenen Dithiothreitol (DTT) abhängt, wenn Selenid bzw. Selenit als Selen-Donor dient. Für diese Experimente wurde das im SelA+D-Extrakt vorhandene DTT durch Gelfiltration (Sephadex G25) vorher abgetrennt.

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, erfolgte mit Selenit als Selen-Donor die Umwandlung von Serin in Selenocystein nur bei Zugabe von DTT (Spur 3). Bei Verwendung von Selenid als Selen-Donor erwies sich die Umwandlungsreaktion als unabhängig von DTT (Spur 5 und 6). In den Kontrollansätzen, in denen die aminoacylierte tRNA ohne Zugabe von zellfreiem Extrakt mit Selenit/DTT (Spur 1) oder mit Selenid/DTT (Spur 4) inkubiert wurde, war kein Selenocystein nachweisbar.

Zusammenfassend kann festgehalten werden:

- 1.) Selenid und nach Zugabe von DTT Selenit können in vitro als Selen-Donor für die Umwandlung von Serin in Selenocystein dienen.
- 2.) Selen in Form von Selenomethionin kann als Selen-Donor nicht verwertet werden.

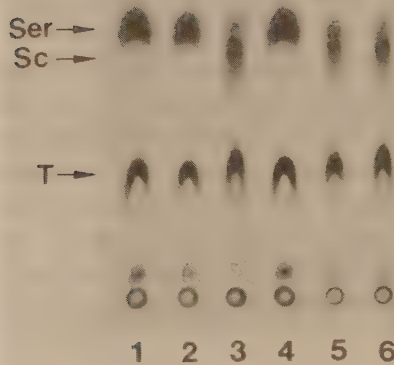


Abbildung 36:

Abhängigkeit der Umwandlungsreaktion von der Anwesenheit von DTT.

In vitro mit ^{14}C -Serin beladene Gesamt-tRNA (50 μg) aus FM420/pMN81 (selC⁺) 30 min bei 28°C inkubiert mit:

Spur 1: 450 pmol Selenit plus 1 mM DTT

Spur 2: 100 μg Protein eines SelA+D-Extrakts plus 450 pmol Selenit

Spur 3: 100 μg Protein eines SelA+D-Extrakts plus 450 pmol Selenit plus 1 mM DTT

Spur 4: 450 pmol Selenid plus 1 mM DTT

Spur 5: 100 μg Protein eines SelA+D-Extrakts plus 450 pmol Selenid

Spur 6: 100 μg Protein eines SelA+D-Extrakts plus 450 pmol Selenid plus 1mM DTT

Abkürzungen: Sc, Selenocystin; Ser, Serin; T, Nebenprodukt der Deacylierung in Tris/Cl Puffer.

3. Kompatibilität des selenierenden Systems von *E. coli* und tRNA_{U_{CA}} aus *Proteus vulgaris*

Die aus der Primärstruktur abgeleitete Sekundärstruktur des selC Genprodukts von *Proteus vulgaris* zeigt die gleichen, vom tRNA-Konsensus abweichenden Besonderheiten wie die selC kodierte tRNA_{U_{CA}} von *E. coli*. Sie ist ebenfalls spezifisch für die Aminosäure L-Serin und kann in *E. coli* den Einbau von Selenocystein in die Selenopolypeptide der Formiatdehydrogenasen vermitteln (52).

Es war nun interessant zu sehen, ob Serin verestert mit tRNA_{U_{CA}} von *Proteus vulgaris* in vitro mittels eines zellfreien Extrakts von *E. coli* in Selenocystein umgewandelt werden kann.

Plasmid pPM5 ist ein Derivat von pUC18 und trägt das selC Gen aus *Proteus vulgaris*. Gesamt-tRNA aus FM420/pPM5, die überproduzierte heterologe tRNA_{U_{CA}} von *Proteus vulgaris* enthielt, und aus FM420/pUC18 wurden von H. Heider zur Verfügung gestellt. Die jeweilige tRNA wurde in einem ersten Schritt in vitro mit ¹⁴C-Serin beladen, und dann mit Sela+D-Extrakt von *E. coli* und Selenid als Selen-Donor inkubiert (Abb. 37). Wie in Spur 3 dieser Abbildung zu sehen ist, wurde Serin aminoacyliert an tRNA_{U_{CA}} von *Proteus vulgaris* in Selenocystein umgewandelt. Im Ansatz mit Gesamt-tRNA, die kein heterologes selC Genprodukt von *Proteus vulgaris* enthielt, war kein Selenocystein nachweisbar (Spur 6). In den jeweiligen Kontrollexperimenten, in denen die aminoacylierte Gesamt-tRNA nur mit Selenid (Spuren 1 und 4) oder nur mit Extrakt (Spuren 2 und 5) inkubiert wurde, erfolgte wie erwartet gleichfalls keine Umwandlung von Serin in Selenocystein.

Die Komponenten des selenierenden Systems von *E. coli* können also die Umwandlung von Serin acyliert an tRNA_{U_{CA}} von *Proteus vulgaris* in Selenocystein katalysieren.



Abbildung 37:

Kompatibilität des "selenierenden Systems" von *E. coli* und tRNA_{UcA} von *Proteus vulgaris*

In vitro mit ^{14}C -Serin beladene Gesamt-tRNA (50 μg) aus FM420/pPM5 (*selC*⁺, aus *Proteus vulgaris*), (Spuren 1, 2, 3), FM420/pUC18 (Spuren 4, 5, 6) für 30 min bei 28°C inkubiert mit:

Spuren 1 + 4: 450 pmol Selenid

Spuren 2 + 5: 100 μg Protein eines SelaD-Extrakts

Spuren 3 + 6: 100 μg Protein eines SelaD-Extrakts plus
450 pmol Selenid

Abkürzungen: Sc, Selenocystin; Ser, Serin; T, Nebenprodukt der Deacylierung in Tris/Cl Puffer.

4. Untersuchungen zur Beteiligung der selA, selB und selD Genprodukte an der Umwandlung von Seryl-trNA_{UCA} in Selenocysteyl-trNA_{UCA}

Die Analyse des Einflusses von Mutationen in selA, selB und selD auf die in vivo Synthese von Selenocysteyl-trNA_{UCA} hat gezeigt, daß die Produkte der Gene selA und selD, nicht jedoch das selB Genprodukt für die Bildung von Selenocysteyl-trNA_{UCA} erforderlich sind.

Die bisherigen Ergebnisse der in vitro Versuche deuten darauf hin, daß die Proteine Sela und Seld an der Umwandlung von Serin in Selenocystein beteiligt sind. In einem weiteren Experiment wurde nun analysiert, ob in der Tat Sela und Seld, nicht aber SelB, für die Umwandlung von Serin in Selenocystein verantwortlich sind.

Für diesen Zweck wurde eine selABD Mutante konstruiert, in der dann mit Hilfe des T7-Expressionssystems entweder das klonierte selA oder das klonierte selD Gen überexprimiert wurde. Die Extrakte wurden dann getrennt oder gemischt in entsprechende Reaktionsansätze eingesetzt und darauf getestet, ob sie die Umwandlung von Serin in Selenocystein katalysieren.

Ausgehend von WL30153 (Δ selAB) wurde dazu ein Stamm konstruiert, der zusätzlich eine Mutation in selD aufweist. Von Winans et al. (123) wurde eine Methode entwickelt, um gezielt Mutationen in chromosomale Gene einzuführen. Dabei wird das entsprechende Gen, das in klonierter Form vorliegen muß, in vitro durch Insertion z.B. eines Antibiotikum-Resistenzgens inaktiviert. Nach Transformation des linearisierten Plasmids in eine recBC sbcB Mutante kommt es durch homologe Rekombination zum Austausch gegen das chromosomale Wildtypallel.

Abbildung 38 zeigt schematisch dieses Vorgehen.

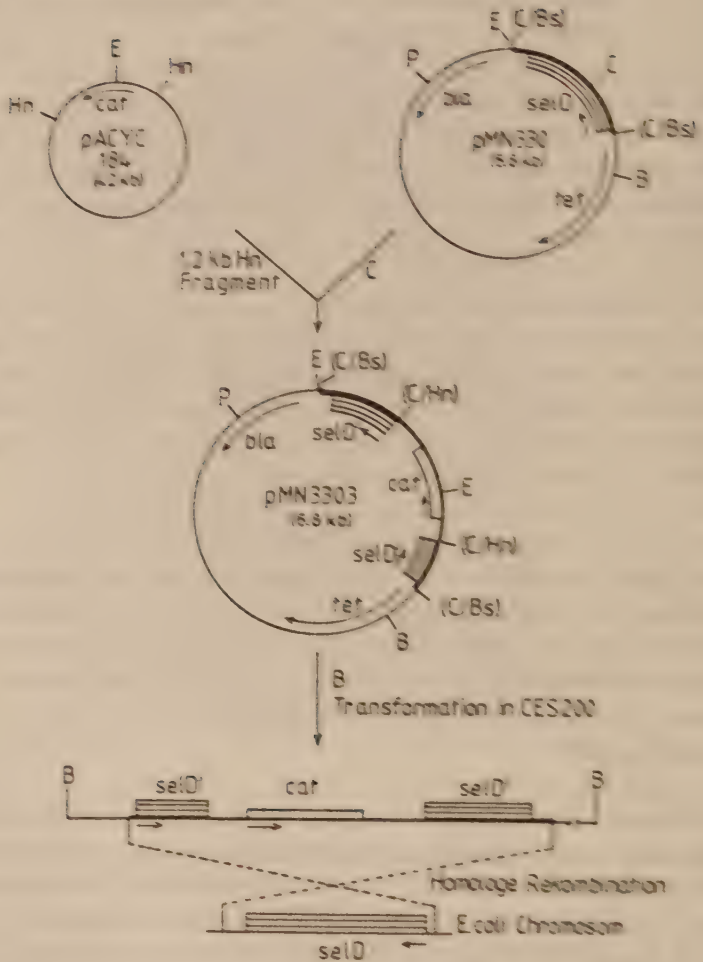


Abbildung 38:

Inaktivierung des chromosomalen *selD* Gens durch Insertion des *cat* Gens von pACYC184.

Im ersten Schritt wurde das klonierte seld⁺ Gen durch die Insertion des Chloramphenicol-Resistenzgens (cat) aus pACYC184 inaktiviert. Dazu wurde ein 1.2 kb HinPI Fragment mit dem cat Gen aus pACYC184 isoliert und in die ClaI-Stelle im seld⁺ Gen (pMN330) ligiert. Das resultierende Plasmid pMN3303 konnte aufgrund der Insertion in seld die Mutante MB08 (seld) nicht mehr komplementieren. 2 µg DNA des Plasmids wurden mit BamHI inkubiert und in CES200 (recBC sbcB) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Chloramphenicol-Resistenz. Unter den erhaltenen Klonen wurden diejenigen, die kein replizierendes Plasmid enthielten und deshalb Ampicillin-sensitiv waren, auf ihren FDH₊-Phänotyp (Gasbildung) und FDH₊-Phänotyp (MacConkey-Nitrat-Platten) getestet. Diese Klone zeigten alle einen FDH-negativen Phänotyp. Aus einer der Mutanten wurde die seld::cat Insertion mittels PI in MC4100 (sel⁺) transduziert. Die Cotransduktionshäufigkeit von Chloramphenicol-Resistenz und seld-Phänotyp betrug dabei 100 %. Alle getesteten Mutanten waren auch durch das Plasmid pMN330 (seld⁺) komplementierbar. Aus einer Mutante (WL400) wurde dann das seld::cat Allel in WL30153 (ΔselAB) transduziert. Der Genotyp des mit WL60153 (ΔselAB seld::cat) bezeichneten Stammes wurde durch eine Komplementationsanalyse mit den Plasmiden pWL184 (selA⁺ selB⁺) und pMN330 (seld⁺) bestätigt.

In WL60153 wurden die Plasmidpaare pGP1-2/pWL187 (selA⁺) bzw. pGP1-2/pMN340 (seld⁺) transformiert. Die Transformanten wurden jeweils anaerob bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 angezogen. Nach Temperatur-Induktion der Expression und einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen anaerob geerntet. Die von diesen Zellen präparierten S100/G25-Extrakte wurden nun jeweils einzeln (je 100 µg Protein) oder gemischt (50 µg + 50 µg) in Testansätze eingesetzt, die 50 µg mit ¹⁴C-Serin beladene Gesamt-tRNA aus FM420/pMN81 und 450 pmol Selenid enthielten. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze ohne Selenid. In Abb.

39 ist das Autoradiogramm der Reaktionsprodukte nach Dünnschichtchromatographie zu sehen.

Die Umwandlung von tRNA_{UcA}-gebundenem Serin in Selenocystein erfolgte in Anwesenheit von Selenid nur nach Inkubation mit dem Extrakt-Gemisch, das sowohl überproduziertes SelA als auch überproduziertes SelD Protein enthielt (Spur 6).

Da in diesem Gemisch kein funktionstüchtiges selB Genprodukt vorhanden ist, zeigt dieses Ergebnis auch die Unabhängigkeit der Umwandlung von Seryl-tRNA_{UcA} in Selenocysteyl-tRNA_{UcA} vom selB Genprodukt.

Die Ergebnisse der in vitro Experimente stimmen mit den Ergebnissen der in vivo Experimente überein, die ebenfalls gezeigt haben, daß das selB Genprodukt nicht essentiell für die Synthese von Selenocystein ist. Ergänzend dazu zeigen die Resultate der in vitro Experimente, daß die Produkte der Gene selA und selD für die Umwandlung von tRNA_{UcA}-gebundenem Serin in Selenocystein erforderlich sind.

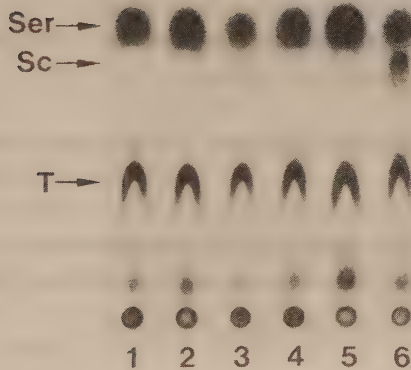


Abbildung 39:

Umwandlung von Seryl-tRNA_{UCA} in Selenocysteyl-tRNA_{UCA} in Abhängigkeit von den selA, selB und selD Genprodukten.

In vitro mit ¹⁴C-Serin beladene Gesamt-tRNA (50 µg) aus FM420/pMN81 (selC⁺) 30 min bei 28°C inkubiert mit:

Spur 1: 100 µg Protein eines Extrakts aus WL60153 (ΔselAB, selD::cat)/pGP1-2/pWL187 (selA⁺)

Spur 2: 100 µg Protein eines Extrakts aus WL60153 (ΔselAB, selD::cat)/pGP1-2/pMN340 (selD⁺)

Spur 3: je 50 µg Protein wie in Spur 1 und 2

Spur 4: wie Spur 1 plus 450 pmol Selenid

Spur 5: wie Spur 2 plus 450 pmol Selenid

Spur 6: wie Spur 3 plus 450 pmol Selenid

Abkürzungen: Sc, Selenocystin; Ser, Serin; T, Nebenprodukt der Deacylierung in Tris/Cl Puffer.

DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Einblick in den Biosyntheseweg und den Einbaumechanismus von Selenocystein in Selenoproteine zu gewinnen.

Sie umfaßt dabei mehrere Teilaspekte:

1. Die Identifizierung von Genen, deren Produkte am Selenstoffwechsel beteiligt sind.
2. Die Charakterisierung dieser Gene durch Klonierung und Sequenzierung.
3. Die Analyse der Funktion der Genprodukte in der Synthese von Selenocystein und im Einbau dieser Aminosäure in Proteine.

1. Identifizierung von Genen, deren Produkte am Selenstoffwechsel in *E. coli* beteiligt sind

Voraussetzung für diese Untersuchung war die Isolierung bzw. Charakterisierung von Mutanten, die einen Defekt im Selenstoffwechsel und deshalb einen pleiotropen FDH-negativen Phänotyp aufweisen.

Eine Mutagenese führte zur Isolierung von 75 pleiotrop FDH-negativen Mutanten. 65 Isolate zeigten einen chloratresistenten Phänotyp, der charakteristisch für Mutanten ist,

in denen es durch einen Defekt im Molybdänstoffwechsel zum Ausfall der Aktivität aller Molybdoenzyme, darunter der beiden Formiatdehydrogenasen (FDH₁ und FDH₂) kommt (40, 115). Die restlichen 10 Mutanten waren hingegen chloratsensitiv. Ein erster Hinweis, daß sie im Selenstoffwechsel defizient sind, war, daß sie Selen weder in das 110 kDa Polypeptid der FDH₁ noch in das 80 kDa Selenopolypeptid der FDH₂ einbauen können.

Die folgenden Ergebnisse bewiesen dann, daß diese Mutanten und früher beschriebene, chloratsensitive, pleiotrop FDH-negative Isolate (47) einen Defekt im Selenstoffwechsel aufweisen:

- Nach Transformation von fdhF(TGA)-lacZ Genfusionen in diese Mutanten kann keine β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden. Dagegen wird β -Galaktosidase gebildet, wenn das TGA Codon in fdhF gegen ein TCA (Serin) Codon ausgetauscht ist (132, diese Arbeit).

Die untersuchten Mutationen blockieren demnach nicht die Transkription des fdhF Gens, sondern sie verhindern das Überlesen des UGA Codons der fdhF mRNA.

- Die Expression des fdhF(TGA)-Gens mit Hilfe des T7-Expressionssystems in diesen Mutanten führt zur ausschließlichen Synthese eines verkürzten 15 kDa Polypeptids. Die Größe dieses Polypeptids korreliert mit der eines Rumpfpепtids, verursacht durch den Abbruch der Translation am UGA Codon der fdhF mRNA; das vollständige 80 kDa Polypeptid wird nicht synthetisiert. Ist hingegen das TGA Codon gegen ein TCA Codon ausgetauscht, wird nur das 80 kDa und kein verkürztes Polypeptid synthetisiert (70).

Die Mutationen kartieren an drei verschiedenen Genorten (47). Durch Komplementationsanalyse und anschließende Sequenzierung wurde ein weiteres Gen identifiziert, dessen Produkt für den Einbau von Selenocystein in Proteine erforderlich ist. Die Gene wurden mit selA, B, C und D bezeichnet (s. Tabelle 10). Acht der zehn Mutanten, die in dieser Arbeit isoliert wurden, konnten dem selA bzw. selB Gen zugeordnet werden. Die restlichen zwei Mutanten (WL4, WL51) wurden nicht weiter untersucht.

Tabelle 10: Eigenschaften von Mutanten mit Defekten im Selenstoffwechsel

Mutanten	Gen- bezeichnung	chromosomale Lokalisation (47)	Einbau von Selen in		Produkt
			tRNA	FDH _M u. FDH _H	
WL2, WL5, WL6, WL14, GY01	selA	80	+	-	50.6 kDa Protein
WL1, WL40, WL98, WL153, GY12	selB	80	+	-	68.8 kDa Protein
MB07	selC	82	+	-	tRNA _{Uca}
MB08	selD	38	-	-	36.6 kDa Protein

2. Charakterisierung der sel Gene

a) Die Gene selA, selB und selD kodieren für Proteine

Die Sequenzanalyse von selA und selB ergab für selA einen offenen Leserahmen, der für ein Protein von 50.6 kDa, und für selB einen offenen Leserahmen, der für ein Protein von 68.8 kDa kodiert. Die offenen Leserahmen beider Gene überlappen um 1 Basenpaar. Welche Bedeutung diese Anordnung für die Expression hat ist noch offen.

Die Gene selA und selB wurden in einem T7 RNA Polymerase/Promotor System exprimiert. Die Größe der dabei erhaltenen Translationsprodukte stimmte mit den aus der DNA-Sequenz abgeleiteten gut überein. Obwohl selB in 3' Richtung von selA liegt, wird dabei mehr selB als selA Genprodukt gebildet. Der Grund hierfür könnte in unterschiedlicher Effizienz der Translationsinitiation oder in einer Regulation auf Ebene der Translation liegen. Untersuchungen mit Hilfe von chromosomal kodierten selA-lacZ bzw. selB-lacZ Genfusionen könnten diese Frage klären.

Die Sequenzanalyse des selD Gens ergab einen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 36.6 kDa kodiert. Entsprechend konnte durch Expression von selD im T7-System auch die Synthese eines Proteins dieses Molekulargewichts nachgewiesen werden (B. Veprek, persönl. Mitteilung). In der 5' flankierenden Region von selAB und selD konnten keine für E. coli typischen Promotorsequenzen (2, 98) gefunden werden. Außerdem war keine signifikante Sequenzähnlichkeit zwischen den 5' flankierenden DNA-Bereichen von selAB und selD feststellbar. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des SelA und SelD Proteins ergab keine signifikante Ähnlichkeit mit Proteinen der Datenbank.

Die Klonierung und Sequenzierung von selC ergab ein überraschendes Ergebnis.

b) Das selC Gen kodiert für eine tRNA

Das selC Gen wurde durch Subklonierung bis auf 233 Basenpaare eingegrenzt. Die Sequenzanalyse ergab Hinweis auf ein Gen, das für eine tRNA-Spezies kodieren kann.

Die folgenden Ergebnisse zeigen an, daß diese tRNA physiologisch aktiv ist:

- Seine 5' flankierende Region zeigt typische E. coli Promotorsequenzen (98) in einem für tRNA Gene charakteristischen Abstand (86) vor dem Strukturgen.
- Die Klonierung und Sequenzierung des mutierten selC^{*} Gens aus MB07 ergab im Vergleich zur Sequenz des Wildtyps einen einzigen Basenaustausch. Dieser Austausch führt zum Ausfall der Selenierung. Er befindet sich in der für alle tRNA Gene universell konservierten Region G₇₁TTC; G₇₁ ist in MB07 gegen A₇₁ ausgetauscht.
- In vitro eingeführte Insertionen in das plasmidkodierte selC^{*} Gen haben den Ausfall der Komplementation der selC^{*} Mutation von MB07 zur Folge.

Die Primär- und Sekundärstruktur der selC kodierten tRNA zeigen folgende Besonderheiten:

- Sie besitzt mit UCA ein Anticodon, das komplementär zum UGA Codon der fdhF mRNA ist. Die Sequenz des Anticodon-Arms ähnelt derjenigen einer tRNA mit einem A in der "wobble" Position des Anticodons. Dieses Strukturmerkmal trägt entscheidend zur Effizienz einer Suppression bei (96).
- Die tRNA weist statt der üblichen 7 Basenpaare einen 8 Basenpaare langen Aminoacyl-Akzeptor-Arm auf. Die Existenz dieses 8 bp langen Akzeptor-Arms wurde auf RNA-

Ebene inzwischen bestätigt (10). Aufgrund dieses Strukturmerkmals und des sehr langen Extra-Arms beträgt die Gesamtlänge dieser tRNA 95 Nukleotide.

- Die durch selC kodierte tRNA besitzt mehrere, von dem Konsensus, der bisher für alle tRNA Moleküle als gültig angesehen wurde (110, 111), abweichende Nukleotide. Sie befinden sich im Bereich des Dihydrouridin-Arms und der Dihydrouridin-Schleife.

3. Analyse der Funktion der sel Genprodukte

a) Die selC kodierte tRNA wird mit L-Serin beladen

Aufgrund der unüblichen Primär- und Sekundärstruktur konnte tRNA_{UCA} a priori keiner tRNA-Spezies mit bekannter Aminosäurespezifität zugeordnet werden. Prinzipiell waren zwei Möglichkeiten vorstellbar:

- Die tRNA wird direkt mit Selenocystein beladen. In diesem Fall wäre die Existenz einer Selenocystein-spezifischen tRNA-Synthetase zu fordern.
- Die tRNA wird mit einer Aminosäure beladen, die dann an der tRNA_{UCA} in Selenocystein umgewandelt wird. Denkbare Möglichkeiten für solche Vorläufer wären Serin oder Cystein.

Die Bestimmung der Aminosäurespezifität wurde durch die Isolierung von Gesamt-tRNA aus einem Stamm, der eine erhöhte Genkopienzahl von selC aufwies, erleichtert. Die in vitro Aminoacylierung mit 10 verschiedenen ¹⁴C-L-Aminosäuren ergab, daß diese Gesamt-tRNA gegenüber Kontroll-tRNA eine stark erhöhte Akzeptorkapazität für L-Serin zeigt. Bei Zugabe von Selenocystein zum Aminoacylierungstest kann keine kompetitive Verdrängung von L-Serin beobachtet wer-

den. Dadurch kann ausgeschlossen werden, daß tRNA_{UcA} direkt mit Selenocystein beladen wird. Auch nach Zugabe von Phosphoserin, einem möglichen Zwischenprodukt in der Synthese von Selenocystein, war keine signifikante Erniedrigung der Beladung mit L-Serin feststellbar. Diese Ergebnisse lieferten bereits starke Hinweise dafür, daß die selC kodierte tRNA_{UcA} mit Serin beladen wird. Der endgültige Beweis wurde dann mit Hilfe einer temperaturlabilen Seryl-tRNA-Synthetase (73) erbracht. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms führte dazu, daß sowohl die als Kontrolle verwendete Gesamt-tRNA als auch die Gesamt-tRNA mit der überproduzierten tRNA_{UcA} nicht mehr mit Serin beladen werden konnte.

Im Bereich des Akzeptor-Stamms zeigt tRNA_{UcA} Sequenzähnlichkeit zu Serin-spezifischen tRNA's. Wie die Daten von verschiedenen Arbeitsgruppen zeigen, sind die drei 5' terminalen Basenpaare entscheidend für die Erkennung einer tRNA^{Ser}-Spezies durch die Seryl-tRNA-Synthetase (80, 88, 97).

Aufgrund dieser Ergebnisse war zu schließen, daß Serin, gebunden an tRNA_{UcA}, die Ausgangsverbindung für die Synthese von Selenocystein ist. Eine erste Bestätigung dafür lieferten Aminoacylierungstests mit mutierten selC Genprodukten, die den in vivo Einbau von Selenocystein nicht mehr vermitteln können. Die Mutationen verhindern die Beladung mit Serin. Dies zeigt, daß die Aminoacylierung des selC Genprodukts mit Serin ein essentieller Schritt im Selenierungsprozeß ist.

Beispiele für eine solche Beteiligung von Aminoacyl-tRNA an biosynthetischen Reaktionen sind bereits bekannt. Mechanismen dieser Art wurden für die Synthese von Chlorophyll in Chloroplasten (64) und für die Umwandlung von Glutamyl-tRNA^{Glu} zu Glutaminyl-tRNA^{Gln} in *Bacillus subtilis* (117) beschrieben.

b) Die Proteine SelA und SelD sind notwendig für die Konversion von L-Serin in Selenocystein

Aus den bisherigen Ergebnissen ergaben sich zwei interessante Fragestellungen:

1. Wird Serin verestert mit tRNA_{UCA} in Selenocystein umgewandelt?
2. Wenn ja, welche Proteine sind an dieser Umwandlung beteiligt?

Um die Basis für diese Untersuchungen zu schaffen, wurde zunächst das in vivo Vorkommen des Endprodukts Selenocysteyl-tRNA_{UCA} nachgewiesen. Ausgehend davon, daß tRNA_{UCA} den Einbau von Selenocystein in FDH_H und FDH_L vermittelt, war anzunehmen, daß eine erhöhte Genkopienzahl von selC in einem sel⁺ Stamm zu einem erhöhten Gehalt an tRNA_{UCA}-gebundenem Selenocystein führt. Es zeigte sich auch eine Korrelation zwischen Genkopien von selC und der Menge an Selenocystein, die sich durch alkalische Hydrolyse von tRNA abdissoziieren ließ.

Weitere Untersuchungen mit sel Mutanten ergaben, daß sowohl das selA als auch das selD Genprodukt für die Synthese von Selenocystein erforderlich sind. Auch in Anwesenheit einer erhöhten selC Genkopienzahl war in diesen Mutanten kein tRNA-gebundenes Selenocystein nachweisbar. Überraschenderweise waren selB Mutanten jedoch durchaus in der Lage, Selenocysteyl-tRNA_{UCA} zu synthetisieren; sie zeigten sogar eine Anhäufung von Selenocysteyl-tRNA_{UCA}. Das selB Genprodukt ist demnach nicht für die Synthese von Selenocystein, sondern allein für den Einbau von Selenocystein in die Proteinkette erforderlich.

Die Synthese von Selenocystein aus Serin an tRNA_{UCA} wurde in einem in vitro System gezeigt. Durch die Verwendung von

^{14}C -Seryl-tRNA_{Sec} ließ sich nachweisen, daß Serin das Kohlenstoffgerüst für Selenocystein liefert. In Übereinstimmung mit den in vivo erhaltenen Ergebnissen ergab die Verwendung von zellfreien Extrakten einer selAB selD::cat Mutante in der entweder das selA oder das selD Gen exprimiert wurde, daß die selA und selD Genprodukte (nicht aber das selB Genprodukt) für die Synthese von Selenocystein aus Serin erforderlich sind. Die Menge der Proteine SelA und SelD (deren Gene in je einer Kopie vorkommen) reicht in vivo aus, um Selenocysteyl-tRNA_{Sec} anzuhäufen. Jedoch konnte in vitro nur mit Extrakten von Zellen, in denen die Gene selA und selD überexprimiert wurden, die Synthese von Selenocystein erreicht werden. Gründe hierfür könnten sein:

- Die Proteine SelA und, oder SelD sind durch die Präparation der Zellextrakte nur teilweise aktiv.
- Die optimalen Reaktionsbedingungen sind noch nicht erreicht.
- In vitro ist eine höhere Konzentration von SelA und SelD notwendig, weil in vivo die katalytische Effizienz beider Proteine, z.B. durch Komplexbildung, höher ist.

selD Mutanten können Selen weder in Proteine noch in tRNA einbauen. Welche Funktion könnte SelD nun haben? Die folgenden zwei Möglichkeiten bestehen:

- SelD hat eine Funktion in der Aufnahme oder der Reduktion von Selenit.
- SelD fungiert in der Synthese oder der Bereitstellung des Selen-Donors für die Umwandlung von Serin in Selenocystein und für den Einbau von Selen in tRNA.

Die Untersuchungen zur in vitro Umwandlung von Serin in Selenocystein zeigen, daß für diese Reaktion Selen in reduzierter (aktivierter?) Form vorliegen muß. Selen in

Form von Selenit kann - im Gegensatz zu Selenid - nur in Anwesenheit von DTT als Selen-Donor dienen. Auch bei Verwendung von Selenid ist jedoch eine Umwandlung von Serin in Selenocystein nur möglich, wenn das seld Genprodukt anwesend ist. Das seld Genprodukt könnte demnach reduziertes Selen möglicherweise in Form von Selenid für beide Reaktionen enzymgebunden bereitstellen. Dies erscheint auch deshalb sinnvoll, weil Selenverbindungen sehr reaktiv sind. Ein weiteres Argument gegen die Möglichkeit, daß das seld Genprodukt an der Aufnahme oder Reduktion von Selenit beteiligt ist, ergibt sich daraus, daß eine seld Mutante intrazellulär Selenomethionin anhäuft (T. Stadtman, persönl. Mitteilung).

Selenocystein kann in vitro im Gegensatz zu Selenomethionin ebenfalls als Selen-Donor für die Umwandlung von Serin in Selenocystein dienen. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, daß Selenocystein, nicht aber Selenomethionin in vitro als Selen-Donor für den Einbau von Selen in tRNA⁶¹ und tRNA¹⁷ dienen kann (126). Die Frage, ob Selenocystein in vivo als Selen-Donor eine Bedeutung zukommt, ist offen.

sela Mutanten können Selen in eine unübliche Base der tRNA⁶¹ und tRNA¹⁷ einbauen, sie können aber kein Selenocystein synthetisieren. Das sela Genprodukt muß also am Austausch der Hydroxyl-Gruppe von Serin gegen die Selenol-Gruppe beteiligt sein. Wie dieser Austausch erfolgt, ist bisher jedoch nicht bekannt. Verschiedene Möglichkeiten sind vorstellbar:

- Die Hydroxyl-Gruppe wird in einem ersten Schritt durch Phosphorylierung oder Acetylierung aktiviert. Als zweiter Schritt erfolgt der Austausch gegen die Selenol-Gruppe.
- Serin wird dehydratisiert, und das entstehende Dehydroalanin wird seleniert.

- Die Hydroxyl-Gruppe von Serin wird direkt gegen eine Selenol-Gruppe ausgetauscht.

Um diesen Reaktionsmechanismus aufzuklären, ist es nötig, ein in vitro System mit gereinigten Komponenten auszuarbeiten. Erst dann kann auch die Frage beantwortet werden, ob neben SelA und SelD weitere Komponenten für die Konversion von Serin in Selenocystein erforderlich sind. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, welche Primär- bzw. Sekundärstrukturmerkmale der tRNA_{UCA} dafür ausschlaggebend sind, daß nur Serin an dieser tRNA und nicht an anderen Isoakzeptoren für Serin in Selenocystein umgewandelt wird. Möglicherweise sind dafür die von der Konsensussequenz aller anderen tRNA-Gene abweichenden Nukleotide im Bereich des Dihydrouridin-Arms und der Dihydrouridin-Schleife von Bedeutung.

c) Das selB Genprodukt zeigt Homologie zu EF-Tu

Im Gegensatz zu SelA und SelD ist das selB Genprodukt nicht für die Bildung von Selenocysteyl-tRNA_{UCA}, sondern allein für den Einbau von Selenocystein in die Selenoproteine der FDH_H und FDH_L erforderlich. Daraus ergibt sich die interessante Frage, welche Funktion dem selB Genprodukt in diesem Prozeß zukommt. Ein Vergleich der Sequenz des SelB Proteins mit der Primärstruktur des Elongationsfaktors Tu aus E. coli (Abb. 40) und anderen Organismen ergab signifikante Ähnlichkeit im aminoterminalen Bereich.

Die Sequenzen GlyXXXXGlyLys und AspXXGly (EF-Tu: Aminosäuren 19-25 und 81-84), die für die Phosphatbindung von Guanosinnukleotiden verantwortlich sind (63, 67), finden sich auch im selB Genprodukt. Für die Guanosin-Spezifität von EF-Tu ist die Sequenz AsnLysXAsp essentiell (EF-Tu: Aminosäuren 136-139) (55). Das selB Genprodukt weist anstelle von Asparagin einen Threoninrest auf. Dieser Austausch hat keine Auswirkung auf die Spezifität, sondern

erniedrigt nur die Affinität des SelB Proteins zu Guanosin-nukleotiden (K. Forchhammer, persönl. Mitteilung).

Neben den drei aufgeführten Regionen, die für alle GDP/GTP bindenden Proteine charakteristisch sind (27), zeigt das selB Genprodukt auch signifikante Sequenzähnlichkeit in Bereichen, die mit der tRNA-abhängigen GTP Hydrolyse (EF-Tu: Aminosäuren 55-62) (122) und der tRNA-Bindung (Aminosäuren 80-101) in Zusammenhang gebracht werden (59, 60, 122).

```

EF-Tu:   1:  MSKEKFERTKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAAITTVIAKTYGGAARAFDQI
              **| ||||| ||| |
SelB:    1:  -----MIIATAGHVDHGKTTLLQAITGVNA-----

EF-Tu:  51:  DNAPEEKARGITINTS-HVEYDTPTRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQM
              | ||| || | | | * * | || * * || * *
SelB:   26:  DRLPEEKKRGMTIDLGYAYWPQDGRVPGFIDVPGHEKFLSNMLAGVGGI

EF-Tu: 100:  DGAILVVAATDGPMPQTREHILLGRQVGVPYIIVFLNKCDMVDDEELLE
              | | * || | | | || || * * | | * | | | | * * |
SelB:   76:  DHALLVVACDDGVMAQTREHLAILQLTGNPMLTVALTKADRVDEARVDE-

EF-Tu: 150:  VEMEVRELLSQYDFPGDDTPIVRGSALKALEGDAEWEAKILELAGFLDSY
              || | * * | | | | * * * * * * * |
SelB:  125:  VERQVKEVLREYGFABEAKLFITAATEGRGMDA---LREHLLQL-----

EF-Tu: 200:  IPEPERAIDKPFLLPIDVFSISGRGTVVTVGRVERGIKVGEEVEIVGIG
              || | | | * * | * * | || | | * * * * *
SelB:  165:  -PEREHASQHSFRLAIDRAFTVKGAGLVVTGTALSGEVKVGDLSLWLTGVN

EF-Tu: 251:  IKETQKSTCTGVEMFRKLLDEGRAGENVGVLLRGI
              * * * * * * * || * * * *
SelB:  214:  VNKPMRVR--ALHAQNQPTETANAGQRIALNIAGD
  
```

Abbildung 40:

Aminosäuresequenzvergleich von SelB und EF-Tu im aminoter-minalen Bereich.

Identische Aminosäuren sind durch Striche, konservative Austausche durch Sterne gekennzeichnet.

Aufgrund dieser Sequenzähnlichkeit sind folgende Modelle vorstellbar:

- Das SelB Protein tritt an die Stelle von EF-Tu und vermittelt den Einbau von Selenocystein am UGA Codon der fdhF mRNA.
- Das SelB Protein ist ein "Hilfsfaktor", der die Erkennung der Selenocysteyl-tRNA_{UGA} durch EF-Tu ermöglicht.

In einer selA Mutante häuft sich Seryl-tRNA_{UGA} an, während eine selB Mutante Selenocysteyl-tRNA_{UGA} akkumuliert. Das UGA Codon der fdhF mRNA kann durch selB Mutanten jedoch nicht überlesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). EF-Tu ist demnach nicht in der Lage mit dieser tRNA-Spezies zu interagieren und seine "normale" Funktion zu erfüllen. Es konnte auch gezeigt werden, daß EF-Tu keinen Ternärkomplex mit Seryl-tRNA_{UGA} bilden kann (M. Sprinzl, persönl. Mitteilung).

Die Strukturmerkmale einer tRNA, die von EF-Tu bei der Bildung eines Ternärkomplexes erkannt werden, sind im Bereich des Aminoacyl-Akzeptor-Arms und des Pseudouridin-Stamms zu finden (33). Abweichend von der üblichen Struktur zeigt tRNA_{UGA} einen um ein Basenpaar längeren Akzeptor-Arm, der möglicherweise die Ausbildung des Ternärkomplexes verhindert.

Durch diese Ergebnisse kann zwar keines der beiden Modelle ausgeschlossen werden, aber es gibt bereits Hinweise, die für das erste, attraktivere Modell sprechen. Das gereinigte SelB Protein kann nämlich einen Binärkomplex mit Selenocysteyl-tRNA_{UGA} - nicht aber mit Seryl-tRNA_{UGA} - bilden (K. Forchhammer, persönl. Mitteilung). Seryl- und Selenocysteyl-tRNA_{UGA} unterscheiden sich nur in der Seitengruppe der Aminosäure (-OH; -SeH). Auffallend ist der Größenunterschied zwischen SelB (70 kDa) und EF-Tu (44 kDa) (1). Eine Möglichkeit besteht darin, daß das selB Genprodukt

eine zusätzliche Domäne besitzt, die spezifisch die Erkennung des Selenocysteyl-Restes ermöglicht.

4. Modell für Synthese und Einbau von Selenocystein in Proteine

Die Produkte der vier identifizierten sel Gene (selA-D) sind essentiell für Biosynthese und Inkorporation von Selenocystein. Aus den bisherigen Ergebnissen kann das in Abbildung 41 gezeigte Arbeitsmodell abgeleitet werden.

Eine Konzentration von 0.1 μ M Selenit im Medium reicht bereits aus, um ein maximales Durchlesen des UGA Codons in plasmidkodierten fdhF-lacZ Genfusionen zu erreichen (132). Dies spricht für die Existenz eines hochaffinen Selenit-Aufnahmesystems (9). Eine genaue Identifikation des Transportsystems als auch die Charakterisierung des Wegs der Selenitreduktion stehen jedoch noch aus. Weitere Details des in Abbildung 41 gezeigten Schemas können aus der Diskussion entnommen werden.

Dieses Modell macht deutlich, daß die Synthese und der Einbau von Selenocystein über ein eigenständiges, spezifisches System erfolgt. Zur Spezifität tragen zumindest drei Faktoren bei:

- Die Synthese von Selenocystein erfolgt an einem Adaptormolekül, nämlich der tRNA_{UCA} , die mit Serin aminoacyliert ist. SelD, als Selen-Donor-Molekül, muß dabei in der Lage sein, hochspezifisch zwischen Schwefel und Selen zu unterscheiden. SelA erkennt nur Serinreste, die mit tRNA_{UCA} verestert sind.
- Für die Dekodierung des UGA Codons der fdhF mRNA ist das SelB Protein unbedingt notwendig, das spezifisch zwischen Seryl- und Selenocysteyl- tRNA_{UCA} unterscheiden kann.

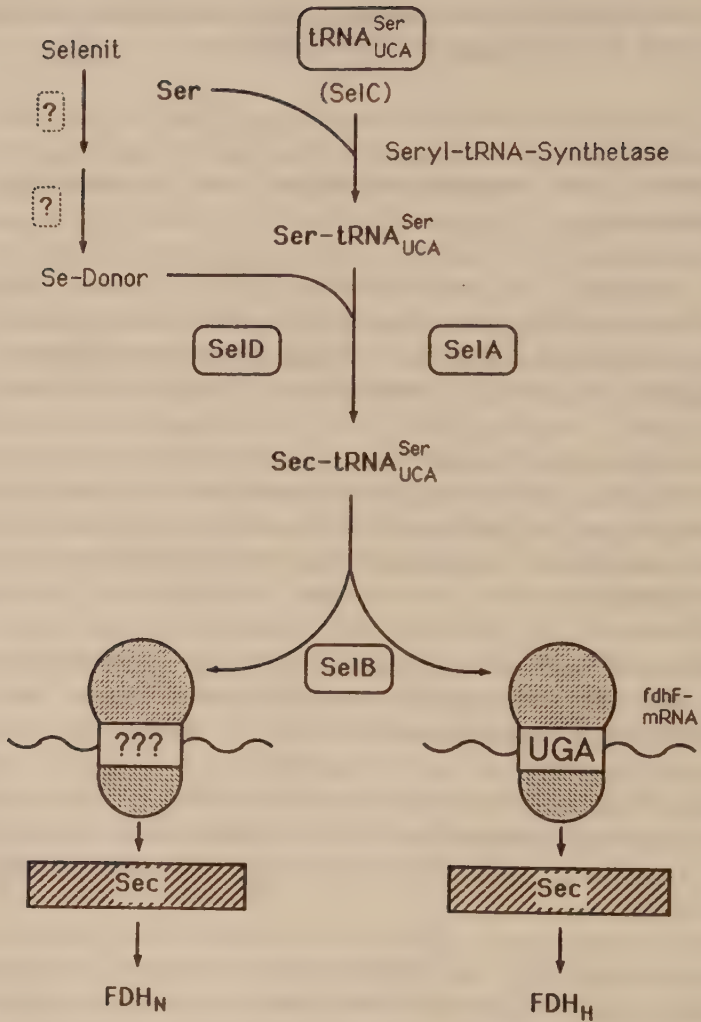


Abbildung 41:

Modell zur Synthese und des Einbaus von Selenocystein in Proteine.

- Der Codonkontext spielt beim Prozeß der Erkundung des UGA Codons eine wesentliche Rolle (F. Zinoni, persönl. Mitteilung). Die beobachtete Spezifität des Einbaus erfordert einen Mechanismus, der zwischen dem UGA Codon der fdhF mRNA und einem UGA Stopp Codon unterscheiden kann. Möglicherweise erkennt der hypothetische SelB/GTP/Selenocysteyl-tRNA_{UcA}-Ternärkomplex auch Sequenzen in der Nachbarschaft des UGA Codons der fdhF mRNA.

5. Verbreitung und Konserviertheit des selenierenden Systems

Bei Verwendung des selC Gens aus *E. coli* als Hybridisierungssonde ergaben sich in allen bisher untersuchten Enterobakterien starke Hybridisierungssignale. Die dadurch bereits angedeutete hohe Sequenzähnlichkeit bzw. Konserviertheit dieses zentralen Gens im Selenierungsprozeß wurde durch Klonierung und Sequenzierung des selC Gens aus *Proteus vulgaris* bestätigt (52). Auch das selC Genprodukt von *Proteus vulgaris* zeigt die von der üblichen tRNA Struktur abweichenden Besonderheiten (52). Die tRNA_{UcA} von *Proteus vulgaris* ist ebenfalls spezifisch für Serin und kann in *E. coli* den Einbau von Selenocystein in Proteine vermitteln (52).

Wie die Analyse der selA1 Mutante von *Salmonella typhimurium* ergab, kann dieser Defekt durch das selD Gen aus *E. coli* komplementiert werden. Die Hybridisierungsanalysen mit dem klonierten selD Gen aus *E. coli* lassen auch hier auf eine hohe Sequenzähnlichkeit dieser Gene schließen. Zusammen zeigen diese Ergebnisse, daß dieser besondere Biosynthese- und Einbauweg der Aminosäure Selenocystein in Enterobakterien hoch konserviert ist, und daß die Komponenten untereinander austauschbar sind.

Der grundlegende Mechanismus der Synthese und des Einbaus von Selenocystein scheint auch in Eukaryonten identisch zu verlaufen. Ein "in-frame" UGA Codon der mRNA des Strukturgens für Glutathionperoxidase kodiert für Selenocystein (12), und das Kohlenstoffgerüst von Selenocystein leitet sich von Serin ab (119). In verschiedenen Eukaryonten wurden zudem natürlich vorkommende Opal-Suppressor-tRNA's gefunden, die spezifisch für Serin sind (50). Serin wird an diesen tRNA's durch eine spezifische Kinase (83) phosphoryliert (49, 76). Inzwischen konnte nachgewiesen werden, daß diese tRNA's in vivo Selenocystein tragen. Es wird daher angenommen, daß der Biosyntheseweg von Selenocystein in Eukaryonten ausgehend von Seryl-tRNA_{UCA} via Phosphoseryl-tRNA_{UCA} zu Selenocysteyl-tRNA_{UCA} verläuft (D. Hatfield, persönl. Mitteilung). Darüberhinaus ist der Nachweis des in vivo Vorkommens von Selenocysteyl-tRNA_{UCA} ein starkes Indiz für einen cotranslationalen Einbau-Modus von Selenocystein.

Es könnte sich also bei dem Biosynthese- und Einbauweg von Selenocystein um einen Mechanismus handeln, der schon sehr früh in der Evolution entwickelt und dann in Pro- und Eukaryonten beibehalten wurde. Weitere Untersuchungen werden sicher Aufschluß über die Konserviertheit beider Systeme geben.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden der Biosyntheseweg von Selenocystein und der Einbau dieser Aminosäure in die zwei Selenoenzyme von *E. coli*, Formiatdehydrogenase N und Formiatdehydrogenase H, untersucht.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Über die Isolierung und Charakterisierung von pleiotrop FDH-negativen Mutanten wurden vier Gene identifiziert, deren Produkte am Selenierungsprozeß beteiligt sind. Die Gene wurden mit selA, B, C und D bezeichnet.

Die Genprodukte von selA, selB und selC sind nur für den Einbau von Selen in Proteine notwendig, während das selD Genprodukt zusätzlich für den Einbau von Selen in Form von 5-Methylaminomethyl-2-Selenouridin in tRNA nötig ist.

Die Gene selA und selB kartieren bei Minute 80 auf dem *E. coli* Chromosom. Das Gen selC befindet sich bei Minute 82, selD bei Minute 38.

2. Die vier identifizierten sel Gene wurden kloniert und sequenziert, um einen Einblick in die Primärstruktur und Funktion der Genprodukte zu erhalten.

Die Gene selA, selB und selD kodieren für Proteine mit Molekulargewichten von 50.6 kDa, 68.8 kDa bzw. 36.6 kDa.

Das selC Gen kodiert für eine tRNA. Die von selC kodierte tRNA weist ein Anticodon der Sequenz UCA auf, das komplementär zum UGA Codon der fdhF mRNA (80 kDa Se-

lenopolypeptid der Formiatdehydrogenase H) ist. Die tRNA_{UCA} zeigt Primär- und Sekundär-Strukturmerkmale, die von dem Konsensus aller anderen tRNA-Spezies in E. coli abweichen.

3. Genetische und biochemische Untersuchungen ergaben einen ersten Einblick in die Funktion der sel Genprodukte und folgendes Bild der Synthese von Selenocystein:

- Die durch selC kodierte tRNA wird durch die Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen.
- Serin wird, verestert mit tRNA_{UCA}, in Selenocystein umgewandelt. Die Produkte der Gene selA und selD sind an dieser Konversion beteiligt. Das selD Genprodukt fungiert möglicherweise als Selen-Donor-Molekül.
- Das selB Genprodukt ist nicht für die Synthese von Selenocysteyl-tRNA_{UCA}, sondern allein für den co-translationalen Einbau von Selenocystein in die Polypeptidkette notwendig. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des selB Genprodukts zeigt im aminoterminalen Bereich signifikante Ähnlichkeit zu derjenigen des Elongationsfaktors Tu aus E. coli. Das selB Genprodukt könnte ein spezifischer Translationsfaktor sein, der für die Dekodierung des UGA Codons der fdhF mRNA nötig ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen einen eigenen Biosyntheseweg von Selenocystein nach und deuten auf einen einzigartigen Dekodierungs-Mechanismus des UGA Codons der fdhF mRNA hin.

LITERATUR

1. **Arai K**, Clark BFC, Duffy L, Jones MD, Kaziro Y,
L'Italian J, Miller DL, Nagarkatti S,
Nakamura S, Nielsen KM, Petersen TE, Takahashi K,
Wade M (1980)
Proc Natl Acad Sci USA 77: 1326-1330.
2. **Ausubel FM** (1984)
Cell 37: 5-6.
3. **Bachmann BJ** (1972)
Bacteriol Rev 36: 525-557.
4. **Barrett EL**, Jackson CE, Fukumoto HT, Chang GW (1979)
Mol Gen Genet 177: 95-101.
5. **Begg YA**, Whyte JA, Haddock BY (1977)
FEMS Mikrobiol Lett 2: 47-50.
6. **Blum P**, Blaha L, Artz S (1986)
Mol Gen Genet 202: 327-330.
7. **Bolivar F**, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC,
Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977)
Gene 2: 95-113.
8. **Brenner M**, Niederwieser A, Pataki G (1967) in Dünnschicht-Chromatographie (Herausgeber E. Stahl)
Springer Verlag Heidelberg. Seiten 696-748.
9. **Brown TA**, Shrift A (1982)
Can J Mikrobiol 28: 307-310.
10. **Burkhard U**, Söll D (1988)
Nucleic Acids Res 24: 11617-11624.
11. **Casadaban MJ**, Cohen SN (1979)
Proc Natl Acad Sci USA 76: 4530-4533.
12. **Chambers I**, Frampton J, Goldfarb P, Affara N,
McBain W, Harrison PR (1986)
EMBO J 5: 1221-1227.

13. **Chang ACY, Cohen SN (1978)**
J Bacteriol 134: 1141-1156.
14. **Chen C-S, Stadtmann TC (1980)**
Proc Natl Acad Sci 77: 1403-1407.
15. **Ching W-M (1984)**
Proc Natl Acad Sci USA 81: 3010-3013.
16. **Ching W-M, Alzner-DeWeerd B, Stadtman TC (1985)**
Proc Natl Acad Sci USA 82: 347-350.
17. **Ching W-M, Stadtman TC (1982)**
Proc Natl Acad Sci USA 79: 374-377.
18. **Ching W-M, Wittwer AJ, Tsai L, Stadtmann TC (1984)**
Proc Natl Acad Sci USA 81: 57-60.
19. **Clarke L, Carbon J (1976)**
Cell 9: 91-99.
20. **Clewell DB (1972)**
J Bacteriol 110: 667-676.
21. **Clewell DB, Helinski D (1969)**
Proc Natl Acad Sci USA 62: 1159-1166.
22. **Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972)**
Proc Natl Acad Sci USA 69: 2110-2114.
23. **Condell RA, Tappel AL (1982)**
Biochim Biophys Acta 709: 304-309.
24. **Cone JE, Martin del Rio R, Davis JN, Stadtman TC (1976)**
Proc Natl Acad Sci USA 73: 2659-2663.
25. **Cox JC, Edwards ES, DeMoss JA (1981)**
J Bacteriol 145: 1317-1324.
26. **Csonka LN (1981)**
Mol Gen Genet 182: 82-86
27. **Dever TE, Glynnias MJ, Merick WC (1987)**
Proc Natl Acad Sci USA 84: 1814-1818.
28. **Dreiseikelmann B, Eichenlaub R, Wackernagel W (1979)**
Biochim Biophys Acta 562: 418-428.
29. **Drews G (1976)**
Mikrobiologisches Praktikum, Springer Verlag.
30. **Ehrenstein G.von, Lipmann F (1961)**
Proc Natl Acad Sci USA 47: 941-950.

31. **Enoch** HG, **Lester** RL (1975)
J Biol Chem 250: 6693-6705.
32. **Fahmy** RA, **Niederwieser** A, **Pataki** G, **Brenner** M (1961)
Helv Chim Acta 44: 2022.
33. **Faulhammer** HG, **Joshi** RL (1987)
FEBS Lett 217: 203-211.
34. **Flohé** L, **Günzler** WA, **Schock** HH (1973)
FEBS Lett 32: 132-134.
35. **Flohé** L, **Straßburger** W, **Günzler** WA (1987)
Chemie in unserer Zeit 21: 44-49.
36. **Forstrom** JW, **Zakowski** JJ, **Tappel** AL (1978)
Biochemistry 17: 2639-2644.
37. **Fraenkel** DG, **Neidhardt** FC (1961)
Biochim Biophys Acta 53: 96-100.
38. **Funatsu** G, **Schiltz** E, **Wittmann** HG (1979)
Mol Gen Genet 114: 106-111.
39. **Giordano** G, **Medani** C-L, **Mandrand-Berthelot** M-A,
Boxer DH (1983)
FEMS Microbiol Lett 17: 171-177.
40. **Glaser** JH, **DeMoss** JA (1972)
Mol Gen Genet 116: 1-10.
41. **Gottesmann** ME, **Yarmolinsky** MB (1968)
J Mol Biol 31: 487-505.
42. **Graham** A, **Boxer** DH (1981)
Biochem J 195: 627-637.
43. **Graham** A, **Jenkins** HE, **Smith** NH, **Mandrand-Berthelot** M-A
Haddock BA, **Boxer** DH (1980)
FEMS Mikrobiol Lett 7: 145-151.
44. **Gray** CP, **Sommer** R, **Polke** C, **Beck** E, **Schaller** H (1978)
Proc Natl Acad Sci USA 75: 50-53.
45. **Gray** CT, **Wimpenny** JWT, **Hughes** DE, **Mossmann** MRC (1966)
Biochem Biophys Acta 117: 22-41.
46. **Günzler** WA, **Steffens** GJ, **Grossman** A, **Kim** S-MA,
Otting F, **Wendel** A, **Flohe** L (1984)
Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 365: 195-212.
47. **Haddock** BA, **Mandrand-Berthelot** M-A (1982)
Biochem Soc Trans 10: 478-480.

48. **Hanahan D** (1983)
J Mol Biol 166: 557-580.
49. **Hatfield D, Diamond A, Dudock B** (1982)
Proc Natl Acad Sci USA 79: 6215-6219.
50. **Hatfield D** (1985)
Trends Biol Sci 10: 201-204.
51. **Hawkes WC, Lyons, D Tappel AL** (1982)
Biochim Biophys Acta 699: 183-191.
52. **Heider J, Leinfelder W, Böck A,** (1989)
Nucleic Acids Res 17: 2529-2540.
53. **Hoh Y-S, Howard AJ, Crapo JD** (1988)
Nucleic Acids Res 16: 5207.
54. **Hohn B, Collins J** (1980)
Gene 11: 291-298.
55. **Hwang YW, Miller D** (1987)
J Biol Chem 262: 13081-13085.
56. **Ihara M, Oda Y, Yamamoto K** (1985)
FEMS Mikrobiol Lett 30: 33-35.
57. **Ishida K, Morino T, Takagi K, Sukenaga Y** (1987)
Nucleic Acids Res 15: 10051.
58. **Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH** (1984)
Gene Anal Technol 1: 3-8.
59. **Jonak J, Petersen TE, Clark BFC, Pychlik J** (1982)
FEMS Lett 150: 485-488.
60. **Jonak J, Prokorna K, Meloun B, Karas K** (1986)
J Biochem 154: 355-362.
61. **Jones JB, Stadtman, TC** (1981)
J Biol Chem 256: 656-663.
62. **Joyet P, Guerineau M, Heslot H** (1985)
FEMS Mikrobiol Lett 21: 353-358.
63. **Jurnak F** (1985)
Science 233: 32-36.
64. **Kannangara CG, P Gough SP, Bryant P, Hooper JK,**
Kahn A, v. Wettstein D (1988).
Trends Biol Sci 13: 139-143.
65. **Kosakowsky HM, Böck A** (1970)
Eur J Biochem 12: 67-73.

66. **Kramer GF**, Ames BN (1988)
J Bacteriol 170: 736-743.
67. **La Cour TFM**, Nyborg J, Thirup S, Clark BFC (1985)
EMBO 4: 2385-2388.
68. **Laemmli UK** (1970)
Nature 227: 680-685.
69. **Larson R**, Messing J (1983)
DNA 2: 31-35.
70. **Leinfelder W**, Forchhammer K, Zinoni F, Sawers G,
Mandrand-Berthelot M-A, Böck A (1988)
J Bacteriol 170: 540-546.
71. **Lennox ES** (1955)
Virology 1: 190-206.
72. **Lester RL**, DeMoss JA (1971)
J Bacteriol 105: 1006-1014.
73. **Low B**, Gates F, Goldstein T, Söll D (1971)
J Bacteriol 180: 742-750.
74. **Lowry OH**, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951)
J Biol Chem 193: 265-275.
75. **Lyons LB**, Zinder ND (1972)
Virology 49: 45-60.
76. **Mäenpää PH**, Bernfield MR (1970)
Proc Natl Acad Sci 67: 688-695.
77. **Mandrand-Berthelot M-A**, Wee MYK, Haddock BA (1978)
FEMS Mikrobiol Lett 4: 37-40.
78. **Maniatis T**, Fritsch EF, Sambrook J (1982)
Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold
Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
79. **Maxam AM**, Gilbert W (1980)
Methods Enzymol 65: 499-560.
80. **McClain WH**, Nicholas HB Jr. (1987)
J Mol Biol 194: 635-642.
81. **Miller JB**, Amy NK (1983)
J Bacteriol 155: 793-801.
82. **Miller JH** (1972)
Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

83. **Mizutani T, Hashimoto A (1984)**
FEBS Lett 169: 319-322.
84. **Mullenbach GT, Tabrizi A, Iroine BD, Bell GI,**
Hallewell RA (1987)
Nucleic Acids Res 15: 5484.
85. **Mullenbach GT, Tabrizi A, Irvine BD, Bell GI,**
Tainer JA, Hallewell RA (1988)
Protein Engineering 2: 239-246.
86. **Nakajima N, Ozeki H, Shinmura Y (1981)**
Cell 23: 239-249.
87. **Norrande J, Kempe T, Messing J (1983)**
Gene 26: 101-106.
88. **Normanly J, Ogden RC, Abelson J, Horvath SJ (1986)**
Nature 321: 213 - 219.
89. **O'Connor MBI, Malamy MH (1983)**
J Bacteriol 156: 669-679.
90. **Patton AR, Chism P (1951)**
Anal Chem 23: 1683.
91. **Pecher A, Zinoni F, Böck A (1985)**
Arch Microbiol 141: 359-363.
92. **Pecher A, Zinoni F, Jatisatienr C, Wirth R,**
Hennecke H, Böck A (1983)
Arch Microbiol 136: 131-136.
93. **Peck HD, Gest H (1957)**
J Bacteriol 73: 706-721.
94. **Pinsent J (1954)**
Biochem J 57: 10-16.
95. **Prentki P, Krisch HM (1984)**
Gene 29: 303-313.
96. **Raftery LA, Yarus M (1987)**
EMBO J 6: 1499-1506.
97. **Rogers MJ, Söll D (1988)**
Proc Natl Acad Sci USA 85: 6627-6631.
98. **Rosenberg M, Court D (1979)**
Annu Rev Genet 13: 319- 53.

99. **Rotruck JT**, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB,
Hafeman DG, Hoekstra WG (1973)
Science 179: 588-590.
100. **Ruiz-Herrera J**, Alvarez A, Figueroa I (1972)
Biochim Biophys Acta 289: 254-261.
101. **Ruiz-Herrera J**, DeMoss JA (1969)
J Bacteriol 99: 720-729.
102. **Ryan MJ**, Belagaje R, Brown EL, Fritz HJ,
Khorana HG, (1979)
J molec Biol 254: 10803-10810.
103. **Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR (1977)
Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467.
104. **Schwarz K**, Foltz CM (1957)
J Am Chem Soc 79: 3292-3293.
105. **Showe MK**, DeMoss JA (1968)
J Bacteriol 95: 1305-1313
106. **Silhavy TJ**, Bermann ML, Enquist LW (1984)
Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
107. **Simons RW**, Houman F, Kleckner N (1987)
Gene 53: 85-96.
108. **Soberon X**, Covarrubias L, Bolivar F (1980)
Gene 9: 287-305.
109. **Southern EM** (1975)
J Mol Biol 98: 503-517.
110. **Sprinzl M**, Moll J, Meissner F, Hartmann T (1985)
Nucleic Acids Res 13: r1-r49.
111. **Sprinzl M**, Vorderwülbecke T, Hartmann T (1985)
Nucleic Acids Res 13: r51-r104.
112. **Stadtman TC** (1979)
Adv Enzymol 48: 1-28.
113. **Stadtman TC** (1980)
Annu Rev Biochem 49: 93-110.
114. **Stadtman TC** (1987)
FASEB J 1: 375-379.
115. **Stewart V** (1988)
Microbiol Rev 52: 190-232.

116. Stormo GD, Schneider TD, Gold LM (1982)
Nucleic Acids Res 10: 2971-2995.
117. Strauch MA, Zalkin H, Aronson A (1988)
J Bacteriol 170: 916-920.
118. Sukenaga Y, Jshida K, Takeda T, Takagi K (1987)
Nucleic Acids Res 15: 7178.
119. Sunde RA, Evenson JK (1987)
J Biol Chem 262: 933-937.
120. Tabor S, Richardson CC (1985)
Proc Natl Acad Sci USA 82: 1074-1078.
121. Turner DC, Stadtman TC (1973)
Arch Biochem Biophys 154: 366-381.
122. Van Noort JM, Kraal B, Singjorgo KM, Persoon NLM,
Johanns ESD, Bosch L (1986)
Eur J Biochem 160: 557-561.
123. Winans SC, Elledge SJ, Heilig Krüger J, Walker GC
(1982)
J Bacteriol 161: 1219-1221.
124. Whitaker JR, Granum PE (1980)
Anal Biochem 109: 156-159.
125. Wittwer AJ (1983)
J Biol Chem 258: 8637-8641.
126. Wittwer AJ, Stadtman TC (1986)
Arch Biochem Biophys 248: 540-550.
127. Wittwer AJ, Tsai L, Ching WM, Stadtman TC (1984)
Biochemistry 23: 4650-4655.
128. Yamamoto J, Saiki T, Liu S.-M., Ljungdahl LG (1983)
J Biol Chem 258: 1826-1832.
129. Yamazaki S (1982)
J Biol Chem 257: 7926-7929.
130. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985)
Gene 33: 103-119.
131. Zakowski JJ, Forstrom JW, Condell RA, Tappel AL (1978)
Biochem Biophys Res Commun 84: 248-253.
132. Zinoni F, Birkmann A, Leinfelder W, Böck A (1987)
Proc Natl Acad Sci USA 84: 3156-3160.

133. Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC, Böck A (1986)
Proc Natl Acad Sci USA 83: 4650-4654.
134. Zubay G, (1962)
J Mol Biol 4: 347-356.

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. A. Böck, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Sein großes Interesse, die hilfreichen Ratschläge und nicht zuletzt die Motivation, die er zu vermitteln wußte, weiß ich sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. H. Nöth schulde ich großen Dank für die Synthese und großzügige Überlassung von Na-Selenid.

Bei Frau Eva Zehelein möchte ich mich für Ihre wertvolle Assistenz bei zahlreichen Versuchen bedanken.

Den "Selen"-Kollegen, vor allem Herrn Dr. F. Zinoni, gilt mein besonderer Dank für zahlreiche Hinweise und die Bereitschaft zur Diskussion. Weiter bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, besonders auch bei meinen Laborkollegen, für die gute Zusammenarbeit und die mir jederzeit gewährte Hilfe.

Frau Martha Rauwolf danke ich für die sorgfältige Reinschrift dieser Arbeit.

L E B E N S L A U F

Name: Walfred Sebastian Leinfelder

Geburtsdatum: 17. Juli 1959

Geburtsort: Monheim, Kreis Donau-Ries

Familienstand: Seit 15.05.1987 verheiratet mit
Roswitha Leinfelder, geb. Baur

Eltern: Hermann Leinfelder,
Landwirt;
Helma Leinfelder,
Hausfrau

Ausbildung:

1965 - 1969 Grundschole in Flotzheim,
jetzt Monheim

1969 - 1978 Theodor-Heuss-Gymnasium,
Nördlingen; Abitur

1978 - 1979 Wehrdienst

1979 - 1985 Studium der Biologie in München
an der Ludwig-Maximilians-Universi-
tät; Diplom

1985 - 1989 Bearbeitung der Dissertation am
Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Universität München, unter
Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck

